



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117925664 A

(43) 申请公布日 2024.04.26

(21) 申请号 202410111905.X *A61K 48/00* (2006.01)
(22) 申请日 2024.01.26 *A61P 27/02* (2006.01)
(66) 本国优先权数据 *A61P 9/10* (2006.01)
PCT/CN2023/134932 2023.11.29 CN *A61P 7/10* (2006.01)
A61P 27/10 (2006.01)
(71) 申请人 上海科锐克医药科技有限公司
地址 201210 上海市浦东新区盛夏路666号
D栋701
(72) 发明人 陈利辉 李骏
(74) 专利代理机构 上海市锦天城律师事务所
31273
专利代理师 倪申文
(51) Int. Cl.
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)

权利要求书3页 说明书34页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

用于递送人VEGF受体融合蛋白的基因递送载体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了用于递送改造的人VEGF受体融合蛋白的基因递送载体,特别是重组腺相关病毒载体,以及它们在治疗VEGF导致的疾病中的应用。本发明还提供了所述改造的人VEGF受体融合蛋白及其编码核酸、载体、细胞以及表达盒。

1. 基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

2. 根据权利要求1所述的基因递送载体,其中所述人VEGF受体融合蛋白进一步包含人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4。

3. 根据权利要求1或2所述的基因递送载体,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域为人IgG1的铰链-Fc结构域。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的基因递送载体,其中人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:如SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的基因递送载体,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的基因递送载体,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1至6任一项所述的基因递送载体,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域包含或为:如SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1所述的基因递送载体,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

9. 根据权利要求8所述的基因递送载体,其中所述表达盒包含:如SEQ ID NO.10或11所示的核苷酸序列,或它们任一个的简并序列。

10. 根据权利要求1至9任一项所述的基因递送载体,其中所述表达盒还包含位于编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列的上游且与其可操作地连接的启动子,所述启动子优选选自巨细胞病毒(CMV)启动子、劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子、MMT启动子、EF-1 α 启动子、U6启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG启动子、CBA启动子、RPE65启动子、VMD2启动子、RPGR启动子、IRBP启动子、hGRK1启动子、CAR启动子、RHO启动子、Grm6启动子、GRK1启动子和GFAP启动子。

11. 根据权利要求1至10任一项所述的基因递送载体,其中所述表达盒还包含位于编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列的下游并与其可操作地连接的聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号优选选自SV40早期polyA、SV40晚期polyA、兔球蛋白polyA、bGH polyA和HSV TK polyA。

12. 根据权利要求1至11任一项所述的基因递送载体,其中所述基因递送载体是

(a) 病毒载体,优选为慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘病毒、乳多空病毒、杆状病毒或乳头状瘤病毒,更优选为腺相关病毒或慢病毒;或

(b) 非病毒载体,优选为质粒、脂质体、纳米颗粒、聚合物、转座子、外泌体或细菌载体。

13. 根据权利要求1至12任一项所述的基因递送载体,所述载体是腺相关病毒载体,其包括:(a)重组腺相关病毒衣壳,和(b)包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的所述核酸。

14. 根据权利要求13所述的基因递送载体,其中所述重组腺相关病毒衣壳包含选自以下血清型的腺相关病毒的衣壳蛋白:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和其杂合体,以及以上述衣壳蛋白为骨架改造的衣壳蛋白突变体;优选地,所述重组腺相关病毒衣壳包含选自AAV1、AAV2、AAV5、AAV7、AAV8和其杂合体的腺相关病毒的衣壳蛋白。

15. 根据权利要求13或14所述的基因递送载体,其中所述腺相关病毒载体的基因组是单链或双链形式,优选为scAAV、ssAAV或cceAAV。

16. 一种药物组合物,其包含权利要求1至15任一项所述的基因递送载体;以及药学上可接受的辅料;优选地,所述药物组合物是注射剂。

17. 权利要求1至15任一项所述的基因递送载体或权利要求16所述的药物组合物在制备用于治疗VEGF导致的疾病的药物中的应用,优选地,VEGF导致的疾病选自渗出性(湿性)老年黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变(DR)合并黄斑水肿(DME)、视网膜静阻塞(RVO)合并黄斑水肿(ME)、中心性渗出性脉络膜视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、高度近视继发脉络膜新生血管病变以及继发的黄斑脉络膜新生血管(CNV)。

18. 一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

19. 根据权利要求18所述的人VEGF受体融合蛋白,其中所述人VEGF受体融合蛋白进一步包含人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4;优选地,所述人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

20. 根据权利要求18或19所述的人VEGF受体融合蛋白,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域为人IgG1的铰链-Fc结构域;优选地,所述人IgG1的铰链-Fc结构域包含或为:如SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

21. 根据权利要求18至20任一项所述的人VEGF受体融合蛋白,其中:

(a) 所述人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:如SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和/或

(b) 所述人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

22. 根据权利要求18所述的人VEGF受体融合蛋白,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

23. 编码权利要求18至22任一项所述的人VEGF受体融合蛋白的多核苷酸;优选地,所述多核苷酸包含或为:如SEQ ID NO.10或11所示的核苷酸序列,或它们任一个的简并序列。

24. 包含权利要求23所述的多核苷酸的载体,优选是质粒;优选地,所述载体被构建以

用于形成ssAAV、scAAV或cceAAV。

25. 包含权利要求24所述载体的宿主细胞,优选是HEK293细胞或sf9细胞。

26. 一种重组腺相关病毒,包含:

(a) rAAV衣壳;和

(b) 被包装在rAAV衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:

(i) 5' AAV ITR; (ii) 启动子; (iii) 权利要求23所述的多核苷酸; (iv) polyA; 和 (v) 3' AAV ITR。

27. 根据权利要求26所述的重组腺相关病毒,其中:

(a) 所述rAAV衣壳包含AAV1、AAV2、AAV5、AAV7或AAV8的衣壳蛋白,优选为AAV8的衣壳蛋白;

(b) 所述启动子为巨细胞病毒(CMV)启动子、EF-1 α 启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、GRK1启动子、或CAG启动子,优选为CMV启动子;

(c) 所述polyA为SV40晚期polyA或兔球珠蛋白polyA,优选为SV40晚期polyA;

(d) 所述5' AAV ITR和/或3' AAV ITR选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5和AAV6的ITR; 和/或

(e) 所述重组腺相关病毒是scAAV、ssAAV或cceAAV。

28. 一种表达盒,其在5'至3'顺序上包含: (i) 启动子; (ii) 权利要求23所述的多核苷酸; (iii) polyA。

29. 根据权利要求28所述的表达盒,其中:

(a) 所述启动子为巨细胞病毒(CMV)启动子、EF-1 α 启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、GRK1启动子或CAG启动子,优选为CMV启动子; 和/或

(b) 所述polyA为SV40晚期polyA或兔球珠蛋白polyA,优选为SV40晚期polyA。

30. 根据权利要求28或29所述的表达盒,其中在所述启动子的5'端和所述polyA的3'端分别包含5' AAV ITR和3' AAV ITR。

用于递送人VEGF受体融合蛋白的基因递送载体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及递送人VEGF受体融合蛋白的基因递送载体,特别是重组腺相关病毒。本发明还涉及所述人VEGF受体融合蛋白,编码该融合蛋白的核酸、包含该核酸的载体、以及包含该载体的宿主细胞。本发明还涉及表达所述人VEGF受体融合蛋白的表达盒,用于形成所述重组腺相关病毒的重组质粒。本发明还涉及上述基因递送载体、融合蛋白、核酸、载体、宿主细胞、表达盒和重组质粒在治疗VEGF导致的疾病,特别是眼科疾病中的用途以及使用它们治疗所述疾病的方法。

背景技术

[0002] VEGF(血管内皮细胞生长因子)在多种眼病的发病机制中起着主要的作用,发病时,眼内VEGF浓度增加,产生不正常的、非常容易出血的新生血管,继而发生大量出血、纤维增殖、牵拉性视网膜脱离、新生血管性青光眼等严重并发症,也可能引起明显的血管渗漏,导致组织持续严重水肿。此类眼科疾病,包括:渗出性(湿性)老年黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变(DR)合并黄斑水肿(DME)、视网膜静脉阻塞(RVO)合并黄斑水肿(ME)、中心性渗出性脉络膜视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、高度近视继发脉络膜新生血管病变、其他疾病继发的黄斑脉络膜新生血管(CNV)等。其中,wAMD和DME发病率相对较高,更为常见。

[0003] 基于中和VEGF的机理,目前已上市了多款用于眼科的抑制血管新生的抗体药物,如雷珠单抗(Ranibizumab)、贝伐珠单抗(Bevacizumab)、阿柏西普(Aflibercept)、康柏西普(Conbercept)等。其中,阿柏西普是一种可溶性、全人源化的融合蛋白,由人VEGFR1的Ig结构域2、人VEGFR2的Ig结构域3和人IgG1的铰链-Fc区组成,可以充当诱饵受体,与VEGF-A、VEGF-B及胎盘生长因子(PlGF)结合,阻止其与受体结合及阻断其下游生物学效应。目前该药物已广泛应用于眼科疾病的临床治疗,FDA已先后批准了阿柏西普在多个适应症的临床应用,包括wetAMD、RVO、DME等。

[0004] 这些药物在治疗与血管新生有关的眼科疾病上取得了成功。但是,现有眼科抗VEGF疗法也有不足:在通常情况下,抗VEGF的药物是目前适合wAMD和DME的一线治疗方案,多个抗VEGF药物,如雷珠单抗、康柏西普和阿柏西普普遍获批上市。目前这些一线抗VEGF药物均为抗体类大分子药物。这类药物代谢周期和半衰期较短,不能在体内长期发挥药效,因此需要对病人玻璃体腔频繁注射给药。以阿柏西普为例,针对新生血管性AMD治疗的推荐给药方案为初始3个月每月玻璃体腔注射给药1次(2mg/次)后每8周玻璃体腔注射给药1次,即3+每8周方案;或者初始3个月每月玻璃体腔注射给药1次(2mg/次),之后采取治疗-延长给药(treat and extend,T&E),即3+T&E方案。现有的治疗手段因其较高的给药频率,加重了病人负担,对用药依从性也提出了更严格的要求。

发明内容

[0005] 通过基因递送载体(如,腺相关病毒、腺病毒、慢病毒、脂质纳米颗粒等)的方式将编码药物蛋白(如,抗体药物、融合蛋白药物等)分子的基因靶向递送至发病部位,可以直接

在体内长期高效表达药物蛋白,可以在病人体内长期稳定发挥疗效,减少给药频率,理论上甚至能做到一次给药长期有效的效果,从而切实减轻病患负担。

[0006] 本发明对阿柏西普蛋白分子中的人IgG1-Fc片段进行YTE

(M252Y/S254T/T256E)定点突变改造,以获得改造的阿柏西普蛋白药物分子(简称“Fc-YTE-阿柏西普”或“Fc-YTE-Aflibercept”),并通过基因递送载体编码该Fc-YTE-阿柏西普蛋白分子基因的方式,获得基因治疗药物(简称“rAAV-Fc-YTE”或“rAAV-Fc-YTE-阿柏西普”)。发明人惊人地发现,该基因治疗药物在不改变药物分子在靶组织中的表达水平和表达分布的情况下,可显著提高对目标疾病的治疗效果。

[0007] 因此,在一个方面,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0008] 在一些实施方式中,所述人VEGF受体融合蛋白进一步包含人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4。

[0009] 在一些实施方式中,所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域为人IgG1的铰链-Fc结构域。

[0010] 在一些实施方式中,其中人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:如SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方式中,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域包含或为:如SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方式中,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方式中,其中所述表达盒包含:如SEQ ID NO.10或11所示的核苷酸序列,或它们任一个的简并序列。

[0016] 在一些实施方式中,其中所述表达盒还包含位于编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列的上游且与其可操作地连接的启动子,所述启动子优选选自巨细胞病毒(CMV)启动子、劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子、MMT启动子、EF-1 α 启动子、U6启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG启动子、CBA启动子、RPE65启动子、VMD2启动子、RPGR启动子、IRBP启动子、hGRK1启动子、CAR启动子、RHO启动子、Grm6启动子、GRK1启动子和GFAP启动子。

[0017] 在一些实施方式中,其中所述表达盒还包含位于编码所述人VEGF受体融合蛋白的

核苷酸序列的下游并与其可操作地连接的聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号优选选自SV40早期polyA、SV40晚期polyA、兔球珠蛋白polyA、bGH polyA和HSV TK polyA。

[0018] 在一些实施方式中,其中所述基因递送载体是(a)病毒载体,优选为慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘病毒、乳多空病毒、杆状病毒或乳头状瘤病毒,更优选为腺相关病毒或慢病毒;或(b)非病毒载体,优选为质粒、脂质体、纳米颗粒、聚合物、转座子、外泌体或细菌载体。

[0019] 在一些实施方式中,所述载体是腺相关病毒载体,其包括:(a)重组腺相关病毒衣壳,和(b)包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的所述核酸。

[0020] 在一些实施方式中,其中所述重组腺相关病毒衣壳包含选自以下血清型的腺相关病毒的衣壳蛋白:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和其杂合体,以及以上述衣壳蛋白为骨架改造的衣壳蛋白突变体;优选地,所述重组腺相关病毒衣壳包含选自AAV1、AAV2、AAV5、AAV7、AAV8和其杂合体的腺相关病毒的衣壳蛋白。

[0021] 在一些实施方式中,其中所述腺相关病毒载体的基因组是单链或双链形式,优选是scAAV、ssAAV或cceAAV。

[0022] 在一些实施方式中,提供一种重组腺相关病毒,包含:(a)rAAV衣壳;和(b)被包装在rAAV衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:

(i)5' AAV ITR;(ii)启动子;(iii)编码本发明提供的人VEGF受体融合蛋白的多核苷酸;(iv)polyA;和(v)3' AAV ITR。

[0023] 在一些实施方式中,所述rAAV衣壳包含AAV1、AAV2、AAV5、AAV7或AAV8的衣壳蛋白,优选为AAV8的衣壳蛋白。

[0024] 在一些实施方式中,所述启动子为巨细胞病毒(CMV)启动子、EF-1 α 启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、GRK1启动子或CAG启动子,优选为CMV启动子。

[0025] 在一些实施方式中,所述polyA为SV40晚期polyA或兔球珠蛋白polyA,优选为SV40晚期polyA。

[0026] 在一些实施方式中,所述5' AAV ITR和/或3' AAV ITR选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5和AAV6的ITR。

[0027] 在一些实施方式中,本发明提供一种表达盒,其在5'至3'顺序上包含:(i)启动子;(ii)编码本发明提供的人VEGF受体融合蛋白的多核苷酸;(iii)polyA。

[0028] 在一些实施方式中,所述启动子为巨细胞病毒(CMV)启动子、EF-1 α 启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、GRK1启动子或CAG启动子,优选为CMV启动子。

[0029] 在一些实施方式中,所述polyA为SV40晚期polyA或兔球珠蛋白polyA,优选为SV40晚期polyA。

[0030] 在一些实施方式中,在表达盒中,在所述启动子的5'端和所述polyA的3'端分别包含5' AAV ITR和3' AAV ITR。

[0031] 本发明的另一个方面提供一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0032] 在一些实施方式中,其中所述人VEGF受体融合蛋白进一步包含人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4;优选地,所述人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:如SEQ ID NO.7

所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方式中,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域为人IgG1的铰链-Fc结构域;优选地,所述人IgG1的铰链-Fc结构域包含或为:如SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施方式中,所述人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:如SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0035] 在一些实施方式中,所述人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0036] 在一些实施方式中,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方式中,本发明提供编码任一所述人VEGF受体融合蛋白的多核苷酸。优选地,所述多核苷酸包含或为:如SEQ ID NO.10或11所示的核苷酸序列,或它们任一个的简并序列。

[0038] 在一些实施方式中,本发明提供包含所述多核苷酸的载体,优选是质粒;优选地,所述载体被构建以用于形成ssAAV、scAAV或cceAAV。

[0039] 在一些实施方式中,本发明提供包含所述载体的宿主细胞,优选是HEK293细胞或sf9细胞。

[0040] 本发明的其他方面和优势可从以下具体描述和实施例中看出。

附图说明

[0041] 图1显示根据本发明的一个实施例用于形成本发明的rAAV-Fc-YTE-阿柏西普的主质粒的质粒图谱。

[0042] 图2显示根据本发明的一个实施例制备的rAAV-Fc-YTE-阿柏西普的结构示意图。

[0043] 图3显示FFA光斑评分,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 代表rAAV-Eylea组、rAAV-Fc-YTE组、阳性药物分子组与阴性对照试剂组相比有显著性差异。

[0044] 图4显示FFA光斑面积,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 代表rAAV-Fc-YTE组与rAAV-Eylea组、阳性药物分子组相比均有显著性差异;阴性对照试剂组与阳性药物分子组相比有显著性差异;rAAV-Eylea与阳性药物分子组相比无显著性差异。

[0045] 图5显示采用Elisa方法检测各组中药物蛋白分子的表达分布水平。

[0046] 图6显示BaseScope技术检测目的药物蛋白基因在视网膜各层细胞中的表达分布情况。

[0047] 图7显示蛋白类药物IVT眼内给药后的FFA光斑评分对比。

[0048] 图8显示蛋白类药物IVT眼内给药后的FFA光斑面积对比。

具体实施方式

[0049] 定义

[0050] 本文可互换使用的术语“病毒载体”或“病毒颗粒”是指由至少一种有包膜或无包膜的病毒衣壳蛋白和被包装的重组病毒基因组组成的病毒颗粒。病毒颗粒包含具有异源多核苷酸的重组病毒基因组,所述异源多核酸包含编码本发明的人VEGF受体融合蛋白和任选的转录调控区。

[0051] 术语“腺相关病毒载体”、“AAV载体”、“腺相关病毒”、“AAV病毒”、“AAV病毒颗粒”、“AAV病毒颗粒”和“AAV颗粒”,在本文中可互换使用,是指由至少一种AAV衣壳蛋白(优选由特定AAV血清型的所有衣壳蛋白组成)和被包装的重组病毒基因组构成的病毒颗粒。所述颗粒包含重组病毒基因组,所述重组病毒基因组具有异源多核苷酸(编码本发明的人VEGF受体融合蛋白)和转录调控区,所述转录调控区至少包含启动子。所述转录调控区还可以包含polyA。

[0052] 如本文所用,术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”),是指外源核酸和/或重组载体已被引入其中的细胞。应该理解的是,“重组宿主细胞”和“宿主细胞”不仅指特定的受试细胞,还指这种细胞的后代。由于突变或环境影响,某些修饰可能会在后代中发生,因此这种后代实际上可能与亲本细胞不相同,但仍包含在本文所用术语“宿主细胞”的范围内。

[0053] 术语“重组病毒基因组”是指其中插入至少一个表达盒的病毒基因组或其部分。如本文所使用的术语“AAV重组病毒基因组”是指其中插入了至少一种表达盒多核苷酸的AAV基因组。根据本发明的AAV基因组的最小“基因组”通常包括顺式作用的5'和3'反向末端重复序列(ITRs)和表达盒。

[0054] 本文使用的术语“表达盒”是指与一系列特定核酸元件重组或合成产生的核酸构建体,其允许在靶细胞中转录特定核酸。根据本发明的AAV载体的AAV重组病毒基因组的表达盒可以包括可操作地连接到编码本发明的人VEGF受体融合蛋白的转录调控区。

[0055] 如本文所用的术语“转录调控区”是指能够调节一个或多个基因表达的核酸片段。根据本发明的转录调控区包括启动子和任选的增强子。本文中使用的术语“启动子”是位于多核苷酸序列上游的核酸片段,其功能是控制一种或多种多核苷酸的转录。任何种类的启动子可用于本发明,包括诱导型启动子、组成型启动子和组织特异性启动子。本文中使用的术语“诱导型启动子”是指在生理或发育上受到调控的启动子,例如通过应用化学诱导剂。例如,它可以是四环素诱导型启动子、米非司酮(RU-486)诱导型启动基等。本文所用的术语“组成型启动子”是指其活性在生物体的所有细胞中或在大多数发育阶段保持在相对恒定水平的启动子,很少或根本不考虑细胞环境条件。组成型启动子的实例包括但不限于逆转录病毒Rous肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地具有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(可选地具有CMV增强子),SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油油激酶(PGK)启动子和EF1a启动子。在细胞中组成性起作用的示例性病毒启动子包括,例如,SV40早期启动子区,包含在劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复序列中的启动子,或疱疹病毒胸苷激酶启动子。

[0056] 本文中使用的术语“增强子”是指与转录因子结合以增加基因转录的DNA序列元件。增强子的实例可以是但不限于RSV增强子、CMV增强子、HCR增强子等。

[0057] 本文中使用的术语“可操作连接”是指启动子序列相对于感兴趣的多核苷酸的功

能关系和位置(例如,如果启动子或增强子影响序列的转录,则其可操作连接到编码序列)。通常,可操作连接的启动子与感兴趣的序列相邻。然而,增强子不必与感兴趣的序列相邻以控制其表达。在另一个实施方案中,启动子和编码本发明的人VEGF受体融合蛋白相邻。

[0058] 术语“治疗有效量”是指无毒但足够量的编码本发明的人VEGF受体融合蛋白的病毒载体,以提供所需的生物学结果。该结果可以是疾病的体征、症状或病因的减少和/或减轻,或者生物系统的任何其他期望的改变。例如,根据本发明的AAV载体的治疗有效量是足以产生所需的生物学结果的量。

[0059] 本文所用的术语“Cap蛋白”是指具有天然AAV Cap蛋白(例如VP1、VP2、VP3)的至少一种功能活性的多肽。Cap蛋白的功能活性的实例包括诱导衣壳形成、促进单链DNA积累、促进AAV DNA包装到衣壳中、结合细胞受体以及促进病毒颗粒进入宿主细胞的能力。原则上,任何Cap蛋白都可以用于本发明的上下文中。本文中使用的术语“衣壳”是指病毒基因组的包装结构。衣壳由几个由蛋白质组成的寡聚结构亚基组成。例如,AAV具有由三种衣壳蛋白VP1、VP2和VP3相互作用形成的二十面体衣壳。

[0060] 如本文所使用的术语“Rep蛋白”是指具有天然AAV Rep蛋白(例如Rep40、52、68、78)的至少一种功能活性的多肽。Rep蛋白的“功能活性”是指与该蛋白的生理功能相关的任何活性。其他功能包括调节AAV(或其他异源)启动子的转录,以及将AAV DNA位点特异性整合到宿主染色体中。在特定实施方案中,AAV rep基因衍生自血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和其杂合体,以及以上述衣壳蛋白为骨架改造的衣壳蛋白突变体。

[0061] 如本文所用,“AAV复制所依赖的病毒蛋白”是指执行AAV复制所依赖的多肽(即“附属功能多肽”)。附属功能包括AAV复制所需的那些功能,包括但不限于参与激活AAV基因转录、阶段特异性AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、帽表达产物的合成和AAV衣壳组装的那些部分。基于病毒的附属功能来源于任何已知的辅助病毒,如腺病毒、疱疹病毒(除1型单纯疱疹病毒外)和牛痘病毒。辅助功能包括但不限于腺病毒E1、E2a、VA和E4或疱疹病毒UL5、ULB、UL52和UL29,以及疱疹病毒聚合酶。在另一个实施方案中,AAV复制所依赖的病毒蛋白来源于腺病毒。

[0062] 本文使用的术语“腺相关病毒ITRs”或“AAV ITRs”是指存在于腺相关病毒基因组DNA链两端的反向末端重复序列。ITR序列是AAV基因组有效增殖所必需的。这些序列的另一个特性是它们形成发夹的能力。这种特性有助于其自启动,从而允许第二条DNA链的独立合成。修改这些ITR序列的程序是本领域已知的。

[0063] 如本文所用,术语“聚腺苷酸化信号”或“polyA”涉及介导聚腺苷链与mRNA的3'末端连接的核酸序列。合适的polyA信号包括但不限于SV40早期polyA信号、SV40晚期polyA信号、兔球珠蛋白polyA、bGH polyA和HSV胸苷激酶(TK)polyA信号。

[0064] 术语“核苷酸或核酸序列”在本文中可与“多核苷酸”互换使用,并且涉及任何长度的核苷酸的任何聚合形式。

[0065] 本文使用的术语“信号肽”是指在蛋白质翻译过程中结合在感兴趣的新生蛋白质的氨基末端的氨基酸残基序列(长度范围为10-30个残基)。信号肽被信号识别颗粒(SRP)识别,并在内质网转运后被信号肽酶切割。

[0066] 本文中使用的术语“受试者”或“对象”是指个体哺乳动物,如人类、非人灵长类动

物(如黑猩猩和其他类人猿和猴子物种)、农场动物(如鸟类、鱼类、牛、绵羊、猪、山羊和马)、家养哺乳动物(如狗和猫)或实验室动物(如啮齿动物,如老鼠、大鼠和豚鼠)。该术语包括任何年龄或性别的受试者。在另一个实施方案中,受试者是哺乳动物,优选地是人类。

[0067] 如本文所用,术语“Fc”是指人IgG(免疫球蛋白)Fc结构域。IgG的亚型如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4均可用作Fc结构域。如本文所用,“Fc区”“Fc结构域”是IgG分子中与通过木瓜蛋白酶消化IgG分子获得的可结晶片段相关的部分。它没有抗原结合活性,但含有碳水化合物部分和补体和Fc受体(包括FcRn受体)的结合位点。Fc区包含整个第二恒定结构域CH2(根据EU编号系统,下同,人IgG1的残基231-340)和整个第三恒定结构域CH3(残基341-447)。术语“铰链”包含从Fc区的N末端延伸的铰链区(残基216-230)的全部或其片段(例如221-230)。“IgG铰链-Fc区”或“铰链-Fc结构域”是指IgG分子的由Fc区(残基231-447)和从Fc区的N末端延伸的铰链区或其片段组成的区域。

[0068] 如本文所用,单链AAV(single-stranded AAV,ssAAV)是指在单独的链上具有转基因表达盒的编码序列并且包装到病毒衣壳中的rAAV,其需要由单链转变为双链的过程,病毒DNA第二链的合成已被证明是病毒基因表达的限速步骤。

[0069] 如本文所用,自互补AAV(self-complementary AAV,scAAV)是在ssAAV基因组右侧ITR删除了一个D序列(包装信号),并且末端解链位点突变(Δ trs),它能够阻止Rep蛋白修饰调节解链切口,增强自我互补双链DNA的包装。双链AAV病毒进入细胞后,不需要一个由单链变为双链的过程,可以直接表达,而且表达水平相对较高。

[0070] 如本文所用,共价闭合末端AAV(covalently closed end AAV,cceAAV)是新近出现的rAAV系统,其通过将AAV基因组的互补双链DNA的一端通过诸如shRNA或寡核苷酸链封闭而形成。cceAAV的一个例子是在W02020/092904中描述的cceAAV系统,通过引用将其完整合并至本文中。

[0071] 基因递送载体

[0072] 本发明的第一个方面提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0073] 在一些实施方式中,所述人VEGF受体融合蛋白进一步包含人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4。因此,在这些实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0074] 在一些实施方式中,所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域为人IgG1的铰链-Fc结构域。因此,在这些实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人IgG1的铰链-Fc结构域;并且所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。在一些实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,

其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4和人IgG1的铰链-Fc结构域；并且所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0075] 在以上任何一个实施方式中,优选地,在表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒中,编码人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4和所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域的核酸按照5'至3'方向依次排列。在其他实施方式中,在表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒中,编码人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4的核酸可以任意顺序在5'至3'方向排列,而编码所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域的核酸位于它们的3'端。在其他实施方式中,在表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒中,编码人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2和人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3的核酸可以任意顺序在5'至3'方向排列,而编码所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域的核酸位于它们的3'端。

[0076] 在以上任何一个实施方式中,优选地,各结构域之间直接连接。在其他实施方式中,各结构域之间可通过肽接头连接。合适的肽接头在本领域是已知的,并且通常有多个甘氨酸和丝氨酸构成。本发明预期任何合适的肽接头都可用于连接所述人VEGF受体融合蛋白的各结构域。

[0077] 在以上任何一个实施方式中,所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号除包含M252Y、S254T和T256E取代之外,还可包含M428L和N434S取代中的一个或多个,已知它们具有增强与FcRn受体相互作用的效果。例如,在一些实施方式中,所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代以及M428L取代。在另一些实施方式中,所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代以及N434S取代。在另一些实施方式中,所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代以及M428L和N434S取代。本发明预期所述人IgG1的铰链-Fc结构域可包含更多的取代。

[0078] 在以上任何一个实施方式中,其中人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2可包含或为:如SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。因此,在一些实施方式中,其中人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,其中人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:在如SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列的N端和/或C端增加或减少1至10个、1至5个或1至3个氨基酸残基。例如,在一些实施方式中,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:在如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的N端增加1至3个氨基酸残基,所增加的氨基酸残基可以是野生型人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2对应位置的氨基酸残基。例如,在一些实施方式中,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:在如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列的C端增加1至3个氨基酸残基,所增加的氨基酸残基可以是野生型人VEGFR1的免疫球蛋白样结构

域2对应位置的氨基酸残基。

[0079] 在以上任何一个实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3可包含或为:如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。因此,在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:在如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的N端和/或C端增加或减少1至10个、1至5个或1至3个氨基酸残基。例如,在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:在如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的N端增加1至3个氨基酸残基,所增加的氨基酸残基可以是野生型人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3对应位置的氨基酸残基。

[0080] 在以上任何一个实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4可包含或为:如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。因此,在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:在如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列的N端和/或C端增加或减少1至10个、1至5个或1至3个氨基酸残基。例如,在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:在如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列的N端增加1至3个氨基酸残基,所增加的氨基酸残基可以是野生型人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4对应位置的氨基酸残基。

[0081] 因此,在一些实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0082] 在另一些实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0083] 在以上任何一个实施方式中,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域可包含或为:如SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包

含M252Y、S254T和T256E取代。因此,在一些实施方式中,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域包含或为:如SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。在一些实施方式中,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域包含或为:如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0084] 因此,在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和氨基酸序列如SEQ ID NO.3或8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0085] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及氨基酸序列如SEQ ID NO.3或8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0086] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0087] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根

据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0088] 在优选的实施方式中,其中所述人VEGF受体融合蛋白在最N端还包括信号肽。信号肽的一个实施例包含或为如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列。

[0089] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0090] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0091] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白是阿柏西普(Aflibercept),并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0092] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白是康柏西普(Conbercept),并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0093] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.10或11所示或它们任一个的简并序列。

[0094] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示或其密码子简并序列。

[0095] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示或其密码子简并序列。

[0096] 在本发明中,密码子简并序列是指根据密码子简并性而获得的参考序列(如SEQ ID NO.10或11所示的核苷酸序列)的变体,如本领域所知,可从包含但不限于针对密码子频率、mRNA二级结构、GC含量、RNase剪接位点、重复序列等中一个或多个方面对参考序列进行优化而得到所述变体,而不改变根据参考序列翻译得到的氨基酸序列。

[0097] 在以上任何一个实施方式中,其中人VEGF受体融合蛋白的表达盒可包含位于编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列的上游且与其可操作地连接的启动子。在优选的实施方式中,所述启动子选自巨细胞病毒(CMV)启动子、劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子、MMT启动子、EF-1 α 启动子、U6启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG启动子、CBA启动子、RPE65启动子、VMD2启动子、RPGR启动子、IRBP启动子、hGRK1启动子、CAR启动子、RHO启动子、Grm6启动子和

GFAP启动子。在更优选的实施方式中,所述启动子是CMV启动子。

[0098] 在一些实施方式中,启动子是组织特异性启动子。在一些实施方案中,组织特异性启动子是眼特异性启动子。眼特异性启动子的实例包括视网膜劈裂蛋白近端启动子、光感受器间类视黄醇结合蛋白增强子(RS/IRBPa)、视紫红质激酶(RK)、RPE65和人视锥细胞视蛋白启动子(human cone opsin promoter)。在一些实施方案中,启动子是鸡 β -肌动蛋白(CB)启动子。鸡 β -肌动蛋白启动子可以是短的鸡 β -肌动蛋白启动子或长的鸡 β -肌动蛋白启动子。在一些实施方案中,启动子(例如,鸡 β -肌动蛋白启动子)包含增强子序列,例如巨细胞病毒(CMV)增强子序列。CMV增强子序列可以是短的CMV增强子序列或长的CMV增强子序列。在一些实施方案中,启动子包含长的CMV增强子序列和长的鸡 β -肌动蛋白启动子。在一些实施方案中,启动子包含短的CMV增强子序列和短的鸡 β -肌动蛋白启动子。然而,本领域技术人员知晓,短的CMV增强子可以与长的CB启动子一起使用,并且长的CMV增强子可以与短的CB启动子一起使用(反之亦然)。

[0099] 在一些实施方式中,所述表达盒还可包含一个或多个内含子。在一些实施方案中,至少一个内含子位于启动子/增强子序列和转基因之间。在一些情况中,可以使用启动子或调控序列元件来指导在眼细胞或眼组织中的选择性表达。例如,可将见于特定眼细胞类型(如视网膜色素上皮细胞)的启动子、序列元件或调控序列用于适宜的表达构建体中(例如RPE65或VMD2启动子)。在一些实施方案中,内含子是合成的或人工的(例如异源的)内含子。合成内含子的实例包括衍生自SV-40的内含子序列(称为SV-40T内含子序列)和衍生自鸡 β -肌动蛋白基因的内含子序列。在一些实施方案中,本公开所述的转基因包含一个或多个(1、2、3、4、5个或更多个)人工内含子。在一些实施方案中,一个或多个人工内含子位于启动子和编码人VEGF受体融合蛋白的核酸序列(或称转基因)之间。在一些情况中,内含子可以指任何可转录但不翻译的序列。在一些情况中,内含子可以指在细胞中转录并从成熟RNA转录本去除的任意序列。在一些情况中,内含子可包含约至少100、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000或5000个核苷酸。在一些情况中,内含子可以为约300个核苷酸。在一些情况中,内含子可以为约200至400个核苷酸。在一些情况中,嵌合内含子可以为约100至500个核苷酸。在一些情况中,内含子可以为完整的天然存在的内含子或嵌合内含子。在一些方面,内含子可包括但不限于CN104994882A中描述的内含子,通过引用将其公开内容全部合并至本文中。

[0100] 在以上任何一个实施方式中,其中人VEGF受体融合蛋白的表达盒可包含位于编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列的下游并与其可操作地连接的聚腺苷酸化信号(polyA)。在优选的实施方式中,所述聚腺苷酸化信号选自SV40早期polyA、SV40晚期polyA、兔球蛋白polyA、bGH polyA和HSV TK polyA。在更优选的实施方式中,所述聚腺苷酸化信号是SV40晚期polyA。

[0101] 因此,在一些实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸和polyA,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0102] 在一些实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸和polyA,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0103] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸和polyA,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0104] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸和polyA,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0105] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸和polyA,其中编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示或其密码子简并序列。

[0106] 在优选的实施方式中,本发明提供一种基因递送载体,其包含核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸和polyA,其中编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示或其密码子简并序列。

[0107] 可用于本发明的基因递送载体可以是病毒载体或非病毒载体。在一些实施方式中,所述基因递送载体是非病毒载体。在优选的实施方式中,所述非病毒载体为质粒、脂质体、纳米颗粒、聚合物、转座子、外泌体或细菌载体。在更优选的实施方式中,所述非病毒载体为质粒、脂质体或纳米颗粒。在最优选的实施方式中,所述非病毒载体为脂质纳米粒(LNP)。

[0108] 在一些实施方式中,所述基因递送载体是病毒载体。在优选的实施方式中,所述病毒载体是慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘病毒、乳多空病毒、杆状病毒或乳头状瘤病毒载体。

[0109] 逆转录病毒载体包括Moloney鼠白血病病毒和基于HIV的病毒。在一些情况中,可以使用基于HIV的病毒载体,其中所述基于HIV的病毒载体包含至少两种载体,其中gag和pol基因来自HIV基因组而env基因来自另一种病毒。可以使用DNA病毒载体。这些载体包括痘载体如正痘病毒(orthopox)或禽痘病毒(avipox)载体,疱疹病毒载体如单纯疱疹I病毒(HSV-1)载体。缺失一个或多个立即早期基因(IE)的HSV-1载体是有利的,因为它们一般是

无细胞毒性的,在靶细胞中持续以类似于潜伏的状态存在,且提供有效的靶细胞转导。重组HSV载体可掺入约30kb的异源核酸。慢病毒载体可以是有利的,因为它们能感染活性分裂和不分裂的细胞两者。它们还可以在转导人上皮细胞时高度有效。用于本公开的慢病毒载体可以源自人和非人(包括SIV)慢病毒。慢病毒载体的例子包括载体增殖所需要的核酸序列以及组织特异性启动子可操作地连接于人VEGF受体融合蛋白基因。核酸序列可包括病毒LTR、引物结合位点、聚嘌呤束、att位点和衣壳化位点。慢病毒载体可包装到任何适宜的慢病毒壳体中。痘病毒载体可将基因引入细胞的细胞质中。禽痘病毒载体可仅导致基因或核酸的短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体可与本公开的编码人VEGF受体融合蛋白核酸一起使用。腺病毒载体可导致比腺相关病毒更短期的表达(例如短于约1个月)。在更优选的实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体或腺相关病毒载体。在最优选的实施方式中,所述病毒载体是腺相关病毒载体。

[0110] 当所述基因递送载体是腺相关病毒载体时,所述基因递送载体也称为重组腺相关病毒载体或重组腺相关病毒(rAAV)。在这样的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:(a)重组腺相关病毒衣壳,和(b)包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。以上关于基因递送载体所包含的核酸以及表达盒的描述适用于rAAV的(b)部分,不再赘述。

[0111] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a)重组腺相关病毒衣壳,和(b)包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和氨基酸序列如SEQ ID NO.3或8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0112] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a)重组腺相关病毒衣壳,和(b)包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及氨基酸序列如SEQ ID NO.3或8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0113] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a)重组腺相关病毒衣壳,和(b)包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依

次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0114] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0115] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0116] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白是阿柏西普(Aflibercept),并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0117] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白是康柏西普(Conbercept),并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0118] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,其中编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.10或11所示或它们任一个的简并序列。

[0119] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括5' AAV ITR、启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸、polyA和3' AAV ITR,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样

结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0120] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括5' AAV ITR、启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸、polyA和3' AAV ITR,其中所述人VEGF受体融合蛋白从N端至C端依次包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0121] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括5' AAV ITR、启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸、polyA和3' AAV ITR,其中所述人VEGF受体融合蛋白包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为:如SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0122] 在优选的实施方式中,本发明提供一种腺相关病毒载体,其包括:

(a) 重组腺相关病毒衣壳,和(b) 包装在所述重组腺相关病毒衣壳内的核酸,所述核酸包含表达人VEGF受体融合蛋白的表达盒,所述表达盒从5'至3'方向依次包括5' AAV ITR、启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸、polyA和3' AAV ITR,其中编码所述人VEGF受体融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.10或11所示或其密码子简并序列。

[0123] 在以上任一腺相关病毒载体的实施方式中,所述重组腺相关病毒衣壳可包含选自以下血清型的腺相关病毒的衣壳蛋白:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和其杂合体,以及以上述衣壳蛋白为骨架改造的衣壳蛋白突变体。在优选的实施方式中,所述重组腺相关病毒衣壳可包含选自AAV1、AAV2、AAV5、AAV7、AAV8和其杂合体的腺相关病毒的衣壳蛋白或由其构成。在更优选的实施方式中,所述重组腺相关病毒衣壳可包含AAV8衣壳蛋白或由其构成。

[0124] 不同AAV血清型的基因组序列的例子可以在文献或公共数据库(如GenBank)中找到。例如,GenBank的登录号为NC_001401.2(AAV2)、NC_001829.1(AAV4)、NC/006152.1(AAV5)、AF028704.1(AAV6)、NC-006260.1(AAV7)、NC.006261.1(AAV8)、AX753250.1(AAV9)和AX753362.1(AAV10)。在一些实施方案中,根据本发明的腺相关病毒载体包含源自血清型的衣壳,所述血清型选自AAV2、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10和AAVrh10血清型。在另一个实施方案中,AAV的血清型是AAV8。如果病毒载体包含编码衣壳蛋白的序列,则可以对其进行修饰,以包含外源序列,从而将AAV引导至特定的一种或多种细胞类型,或提高靶向载体递送至细胞的效率,或促进AAV的纯化或检测,或降低宿主反应。

[0125] 在一些实施方案中,AAV衣壳蛋白具有对眼组织或肌肉组织的嗜性。在一些实施方案中,眼组织包括眼神经元、视网膜、巩膜、脉络膜、视网膜、玻璃体、黄斑、中心小凹、视盘、晶状体、瞳孔、虹膜、房水、角膜、结膜睫状体或视神经。在一些实施方案中,AAV衣壳蛋白靶

向眼细胞类型(例如,感光细胞、视网膜细胞等)。

[0126] 在以上任一腺相关病毒载体的实施方式中,所述腺相关病毒载体的基因组是单链或双链形式,优选是scAAV、ssAAV或cceAAV中的任何一种。本领域技术人员可以根据实际需要选择其中任何一个系统形成本发明的腺相关病毒载体。

[0127] 在一些实施方式中,本发明提供一种重组腺相关病毒,包含:(a) rAAV衣壳;和(b) 被包装在rAAV衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:(i) 5' AAV ITR;(ii) 启动子;(iii) 编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iv) polyA;和(v) 3' AAV ITR,其中对于启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸以及polyA,适用以上关于基因递送载体的对应成分的描述,不再赘述。

[0128] 在优选的实施方式中,所述rAAV衣壳包含AAV1、AAV2、AAV5、AAV7或AAV8的衣壳蛋白或由其构成,优选为AAV8的衣壳蛋白或由其构成。

[0129] 在优选的实施方式中,所述5' AAV ITR和/或3' AAV ITR选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5和AAV6的ITR。

[0130] 在一个具体的实施方式中,本发明提供一种重组腺相关病毒,包含:

(a) rAAV8衣壳;和(b) 被包装在rAAV8衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:(i) 5' AAV ITR;(ii) CMV启动子;(iii) 编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iv) SV40晚期polyA;和(v) 3' AAV ITR,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列。

[0131] 在一个具体的实施方式中,本发明提供一种重组腺相关病毒,包含:

(a) rAAV8衣壳;和(b) 被包装在rAAV8衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:(i) 5' AAV ITR;(ii) CMV启动子;(iii) 编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iv) 兔球珠蛋白polyA;和(v) 3' AAV ITR,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列。

[0132] 在一个具体的实施方式中,本发明提供一种重组腺相关病毒,包含:

(a) rAAV2衣壳;和(b) 被包装在rAAV2衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:(i) 5' AAV ITR;(ii) CMV启动子;(iii) 编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iv) SV40晚期polyA;和(v) 3' AAV ITR,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列。

[0133] 在一个具体的实施方式中,本发明提供一种重组腺相关病毒,包含:

(a) rAAV2衣壳;和(b) 被包装在rAAV2衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:(i) 5' AAV ITR;(ii) CMV启动子;(iii) 编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iv) 兔球珠蛋白polyA;和(v) 3' AAV ITR,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列。

[0134] 在一个具体的实施方式中,本发明提供一种重组腺相关病毒,包含:

(a) rAAV1衣壳;和(b) 被包装在rAAV1衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:(i) 5' AAV ITR;(ii) 鸡 β -肌动蛋白启动子;(iii) 编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iv) 兔球珠蛋白polyA;和(v) 3' AAV ITR,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列。

[0135] 在一个具体的实施方式中,本发明提供一种重组腺相关病毒,包含:

(a) rAAV1衣壳;和(b)被包装在rAAV1衣壳内的核酸,所述核酸在5'至3'顺序上包含:(i)5' AAV ITR;(ii)鸡 β -肌动蛋白启动子;(iii)编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iv)SV40晚期polyA;和(v)3' AAV ITR,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如SEQ ID NO.5或9所示的氨基酸序列。在本发明的一些实施方式中,所述重组腺相关病毒是scAAV、ssAAV或cceAAV中的任何一种。

[0136] 在一些实施方式中,本发明提供一种表达盒,其在5'至3'顺序上包含:(i)启动子;(ii)编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iii)polyA,其中对于启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸以及polyA,适用以上关于基因递送载体的对应成分的描述,不再赘述。

[0137] 在一些实施方式中,本发明提供一种表达盒,其在5'至3'顺序上包含:(i)5' AAV ITR;(ii)启动子;(iii)编码人VEGF受体融合蛋白的核酸;(iv)polyA;和(v)3' AAV ITR,其中对于ITR、启动子、编码人VEGF受体融合蛋白的核酸以及polyA,适用以上关于基因递送载体或重组腺相关病毒的对应成分的描述,不再赘述。

[0138] 可以使用三重转染(三质粒转染)方法产生重组AAV。通常,重组AAV是通过用待包装进AAV颗粒的AAV载体(包含侧翼为ITR元件的转基因)、AAV辅助功能载体和附属功能载体转染宿主细胞而产生的。AAV辅助功能载体编码“AAV辅助功能”序列(例如,rep和cap),其反式提供AAV复制和封装所需的功能性蛋白。附属功能载体编码用于非AAV衍生的病毒和/或细胞功能的核苷酸序列,AAV依赖于这些功能进行复制(例如,“附属功能”)。附属功能包括AAV复制所需的那些功能,包括但不限于参与AAV基因转录激活、阶段特异性AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、cap表达产物合成和AAV衣壳组装的那些部分。基于病毒的附属功能可以源自任何已知的辅助病毒,例如腺病毒、疱疹病毒(1型单纯疱疹病毒除外)和牛痘病毒。

[0139] 编码人VEGF受体融合蛋白及其编码核酸

[0140] 本发明的另一个方面提供一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0141] 在一些实施方式中,所述人VEGF受体融合蛋白进一步包含人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4。因此,在这些实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0142] 在一些实施方式中,所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域为人IgG1的铰链-Fc结构域。因此,在这些实施方式中,本发明提供人VEGF受体融合蛋白,其包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人IgG1的铰链-Fc结构域;并且所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。在一些实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4和人IgG1的铰链-Fc结构域;并且所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0143] 在以上任何一个实施方式中,优选地,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4和所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域按N端至C端依次排列。在其他实施方式中,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域

2、人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4的核酸可以任意顺序排列,而所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域位于最C端。在其他实施方式中,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2和人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3按N端至C端排列,而所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域位于最C端。

[0144] 在以上任何一个实施方式中,优选地,各结构域之间直接连接。在其他实施方式中,各结构域之间可通过肽接头连接。合适的肽接头在本领域是已知的,并且通常有多个甘氨酸和丝氨酸构成。本发明预期任何合适的肽接头都可用于连接所述人VEGF受体融合蛋白的各结构域。

[0145] 在以上任何一个实施方式中,所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号除包含M252Y、S254T和T256E取代之外,还可包含M428L和N434S取代中的一个或多个,已知它们具有增强与FcRn受体相互作用的效果。例如,在一些实施方式中,所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代以及M428L取代。在另一些实施方式中,所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代以及N434S取代。在另一些实施方式中,所述人IgG1的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代以及M428L和N434S取代。本发明预期所述人IgG1的铰链-Fc结构域可包含更多的取代。

[0146] 在以上任何一个实施方式中,其中人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2可包含或为:如SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。因此,在一些实施方式中,其中人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,其中人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:在如SEQ ID NO.1或6所示的氨基酸序列的N端和/或C端增加或减少1至10个、1至5个或1至3个氨基酸残基。例如,在一些实施方式中,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:在如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的N端增加1至3个氨基酸残基,所增加的氨基酸残基可以是野生型人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2对应位置的氨基酸残基。例如,在一些实施方式中,人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2包含或为:在如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列的C端增加1至3个氨基酸残基,所增加的氨基酸残基可以是野生型人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2对应位置的氨基酸残基。

[0147] 在以上任何一个实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3可包含或为:如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。因此,在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:在如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的N端和/

或C端增加或减少1至10个、1至5个或1至3个氨基酸残基。例如,在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3包含或为:在如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的N端增加1至3个氨基酸残基,所增加的氨基酸残基可以是野生型人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3对应位置的氨基酸残基。

[0148] 在以上任何一个实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4可包含或为:如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。因此,在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:在如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列的N端和/或C端增加或减少1至10个、1至5个或1至3个氨基酸残基。例如,在一些实施方式中,其中人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4包含或为:在如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列的N端增加1至3个氨基酸残基,所增加的氨基酸残基可以是野生型人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4对应位置的氨基酸残基。

[0149] 因此,在一些实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0150] 在另一些实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0151] 在以上任何一个实施方式中,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域可包含或为:如SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.3或8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。因此,在一些实施方式中,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域包含或为:如SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。在一些实施方式中,其中所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域包含或为:如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0152] 因此,在优选的实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和氨基酸序列如SEQ ID NO.3或8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0153] 在优选的实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1或6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及氨基酸序列如SEQ ID NO.3或8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0154] 在优选的实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0155] 在优选的实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其从N端至C端依次包含氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2、氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示或与其具有至少80%序列同一性的人VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4以及氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示或与其具有至少80%序列同一性的人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0156] 在优选的实施方式中,其中所述人VEGF受体融合蛋白在最N端还包括信号肽。信号肽的一个实施例包含或为如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列。

[0157] 在优选的实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:

SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0158] 在优选的实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白包含或为如:

SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0159] 在优选的实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人免疫球蛋

白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白是阿柏西普(Aflibercept),并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0160] 在优选的实施方式中,本发明提供一种人VEGF受体融合蛋白,其包含人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域,所述人VEGF受体融合蛋白是康柏西普(Conbercept),并且所述人免疫球蛋白的铰链-Fc结构域根据EU编号包含M252Y、S254T和T256E取代。

[0161] 在一些实施方式中,本发明提供编码以上任何一个实施方式的人VEGF受体融合蛋白的多核苷酸,例如DNA或RNA。在优选的实施方式中,所述多核苷酸包含或为:如SEQ ID NO.10或11所示的核苷酸序列,或它们任一个的简并序列。在优选的实施方式中,所述多核苷酸为如SEQ ID NO.10或11所示的核苷酸序列。

[0162] 在一些实施方式中,本发明提供包含所述多核苷酸的载体,例如质粒。在一些实施方式中,所述质粒包含以上任一个表达盒实施方式所述的表达盒。在一些方面,将抗生素抗性基因引入质粒中。抗生素抗性标志物可用于鉴定在重组病毒生成中的阳性转基因细胞。在一些方面,抗生素标志物包含编码抗生素抗性基因的序列。例如赋予抗性的标志物可包括但不限于,卡那霉素、艮他霉素、氨苄青霉素、氯霉素、四环素、强力霉素或潮霉素。在一些方面,所述抗生素抗性基因是非beta-内酰胺抗生素抗性基因,如卡那霉素。在一些实施方式中,所述载体或质粒被构建以用于形成ssAAV、scAAV或cceAAV。在一个实施例中,所述质粒例如是图1所示的质粒,其用于形成cceAAV。

[0163] 在一些实施方式中,本发明提供包含具有所述多核苷酸的载体的宿主细胞,所述宿主细胞是非人的,例如是HEK293细胞。其他细胞也是可行的,例如CHO细胞。在一些实施方式中,所述细胞被转染有所述包含多核苷酸的载体。此外,所述细胞还同时被转染例如上文所述的辅助质粒和附属质粒,其中辅助质粒例如是提供AAV的rep和Icap基因,所述附属质粒例如提供用于AAV复制的E2、E4a和/或VA等基因。

[0164] 药物组合物、疗法及适应症

[0165] 本发明的另一个方面提供一种药物组合物,其包含本发明所述的任何一种基因递送载体(如rAAV);以及药学上可接受的辅料。

[0166] 本发明的另一个方面提供一种药物组合物,其包含本发明提供的任何一种人VEGF受体融合蛋白;以及药学上可接受的辅料。

[0167] 在一些实施方案中,配制rAAV组合物以减少组合物中AAV颗粒的聚集,尤其是在存在高rAAV浓度(例如,~10¹³GC/mL或更高)的情况下。减少rAAV聚集的方法是本领域公知的,并且包括例如添加表面活性剂、调节pH、调节盐浓度等。药学上可接受的赋形剂和辅料溶液的配制,以及开发用于在多种治疗方案中使用本文所述的特定组合物的合适的给药和治疗方案,是本领域技术人员公知的。

[0168] 在某些情况下,希望通过玻璃体内、眼内、视网膜下、皮下、胰内、鼻内、胃肠外、静脉内、肌内、鞘内、经口、腹膜内或吸入之一来递送本文公开的合适配制的药物组合物中的基于rAAV的治疗构建体。在一些实施方案中,优选的施用方式是通过静脉注射。

[0169] 适合注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散液,以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和在油中制备分散液。在一般储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。在许多情况下,所述形式是无菌的,并且流动性达到容易注射的程度。它必须在制造和储存条件下保持稳

定,并且其保存必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。辅料可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适混合物和/或植物油。合适的流动性可以例如通过使用包衣剂例如卵磷脂、通过在分散体的情况下保持所需粒径和通过使用表面活性剂来保持。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂来防止微生物的作用,例如对羟基苯甲酸酯、三氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖类或氯化钠。可通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,引起可注射组合物的延长吸收。

[0170] 例如,对于可注射水性溶液的施用,如果需要,可以将溶液适当地缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水性溶液尤其适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这个方面,可以使用的无菌水性介质是本领域技术人员已知的。

[0171] 通过将所需量的活性rAAV与本文列举的各种其他成分(根据需要)并入合适溶剂中,然后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,分散液是通过将各种经灭菌的活性成分并入含有基础分散介质和来自上述列举的那些的所需其他成分的无菌媒介物中来制备的。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。

[0172] 本文公开的rAAV组合物也可配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成),其与无机酸如盐酸或磷酸,或有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。通过配制,溶液将以与剂量制剂相容的方式并以治疗有效的量施用。所述制剂易于以多种剂型施用,例如可注射溶液、药物释放胶囊等。

[0173] 如本文所用,“辅料”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣剂、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域公知的。补充活性成分也可以并入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用给宿主时不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。

[0174] 诸如脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等递送媒介物可用于将本公开的组合物引入合适的宿主细胞中。特别地,rAAV载体递送的转基因可以被配制用于包封在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中递送。此类制剂可优选用于引入本文公开的核酸或rAAV构建体的药学上可接受的制剂。脂质体的形成和使用通常是本领域技术人员已知的。目前,开发了具有改善的血清稳定性和循环半衰期的脂质体。

[0175] 在一些情况下,通过基质内施用或皮下注射靶向眼部(例如,角膜)组织可能需要与通过另一种方法(例如,全身施用,外用施用)不同(例如,更高或更低)的剂量。因此,在一些实施方案中,注射是基质内注射(IS)。在一些实施方案中,注射是外用施用(例如,外用施用至眼)。在一些情况下,施用多个剂量的rAAV。

[0176] 在一些实施方案中,如本文所述的rAAV的施用导致转基因(例如,

KH902)向眼组织的递送。可以通过例如眼内注射、视网膜下注射、外用施用(例如滴眼剂)或通过注射至哺乳动物受试者的眼中(例如,玻璃体内注射)来将rAAV递送至哺乳动物受试者的眼组织。如本文所用,“眼组织”是指源自眼或包含在眼中的任何组织。眼组织的非限制性实例包括神经元、视网膜(例如,感光细胞)、巩膜、脉络膜、视网膜、玻璃体、黄

斑、中心小凹、视盘、晶状体、瞳孔、虹膜、房水、角膜(例如,角质细胞、角膜内皮细胞、角膜基底细胞、角膜翼细胞和角膜鳞状细胞)、结膜睫状体和视神经。视网膜位于眼的后部,并且包含感光细胞。这些感光细胞(例如,视杆细胞、视锥细胞)通过辨别颜色来赋予视觉灵敏度(visual acuity),以及视野中的对比度。

[0177] 或者,可以通过肌肉注射或通过施用至哺乳动物受试者的血流中来将rAAV递送至哺乳动物受试者。可以通过注射至静脉、动脉或任何其他血管导管中来施用至血流中。rAAV的肌肉施用的非限制性示例性方法包括肌肉(IM)注射和血管内输注。在一些实施方案中,如本公开中所述的rAAV或组合物通过玻璃体内注射施用。在一些实施方案中,如本公开中所述的rAAV或组合物通过眼内注射施用。在一些实施方案中,如本公开中所述的rAAV或组合物通过视网膜下注射施用。在一些实施方案中,如本公开中所述的rAAV或组合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,如本公开中所述的rAAV或组合物通过肌肉注射施用。

[0178] 在一些实施方案中,施用如本文所述的rAAV导致VEGF(例如,VEGF活性)的抑制。在一些实施方案中,如本文所述的rAAV的施用导致眼组织中VEGF(例如,VEGF活性)的抑制。可以通过任何合适的已知方法(例如,HUVEC血管生成测定、视网膜血管发育测定、视网膜水肿测定、激光损伤诱导的脉络膜新生血管(CNV)等)来测量VEGF抑制的程度。在一些实施方案中,接受了抗VEGF剂(例如,注射了本文所述的rAAV)的受试者中的VEGF(例如,VEGF活性)活性与未经注射的受试者或接受所述抗VEGF剂之前的同一受试者相比,被抑制至少2%、至少5%、至少10%、至少15%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、或至少100%。在一些实施方案中,未经注射的受试者或接受抗VEGF剂之前的受试者中的VEGF(例如,VEGF活性)比接受了抗VEGF剂施用(例如,注射了本文所述的rAAV)的受试者高至少2%、至少5%、至少10%、至少15%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少100%、至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少10至50倍(例如,10倍、20倍、30倍、40倍或50倍)、至少50至100倍(例如,50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍)。

[0179] 在一些实施方案中,抗VEGF剂(例如,本文所述的rAAV)的施用导致VEGF(例如,VEGF活性)被抑制长于1天、长于2天、长于3天、长于4天、长于5天、长于6天、长于7天、长于1周(例如,8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天)、长于2周(例如,15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天)、长于3周(例如,22天、23天、24天、25天、26天、27天或28天)、长于4周(例如,29天、30天、40天、50天、60天、100天或更多)、长于1个月(例如,5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周)、长于2个月(例如,2个月至2.5个月之间、2个月至3个月之间、2个月至4个月之间、2个月至5个月之间、2个月至6个月之间、2个月至7个月之间、2个月至8个月之间、2个月至9个月之间、2个月至10个月之间、2个月至11个月之间、2个月至12个月之间)、长于3个月(例如,3个月至4个月之间、3个月至5个月之间、3个月至6个月之间、3个月至7个月之间、3个月至8个月之间、3个月至9个月之间、3个月至10个月之间、3个月至11个月之间、3个月至12个月之间)、长于4个月(例如,4个月至5个月之间、4个月至6个月之间、4个月至7个月之间、4个月至8个月之间、4个月至9个月之间、4个月至10个月之间、4个月至11个月之间、4个月至12个月之间)、长于5个月(例如,5个月至6个月之间、5个月至7个月之间、5个月至8个月

之间、5个月至8个月之间、5个月至9个月之间、5个月至10个月之间、5个月至11个月之间、5个月至12个月之间)、长于6个月(例如6个月至7个月之间、6个月至8个月之间、6个月至9个月之间、6个月至10个月之间、6个月至11个月之间、6个月至12个月之间)、长于7个月(例如,7个月至8个月之间、7个月至9个月之间、7个月至10个月之间、7个月至11个月之间、7个月至12个月之间)、长于8个月(例如,8个月至9个月之间、8个月至10个月之间、8个月至11个月之间、8个月至12个月之间)、长于9个月(例如,9个月至10个月之间、9个月至11个月之间、9个月至12个月之间)、长于10个月(例如,10个月至11个月之间、11个月至12个月之间)、长于11个月(例如,11个月至12个月之间)、长于12个月(例如,12至15个月之间、12至18个月之间、12至21个月之间、12-2个月之间)、长于1年(例如,1至1.5年之间)、长于2年、长于3年、长于4年、长于5年、长于10年、长于15年、长于20年或更长。

[0180] 本公开的组合物可以包含单独的rAAV,或与一种或多种其他病毒(例如,编码具有一种或多种不同转基因的第二rAAV)组合的rAAV。在一些实施方案中,组合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种不同的rAAV,每种具有一种或多种不同的转基因。

[0181] rAAV或组合物的有效量是足以靶向感染动物、靶向目标组织(例如,肌组织、眼组织等)的量。在一些实施方案中,有效量将主要取决于诸如物种、年龄、体重、受试者的健康和待靶向的组织等因素,因此可以在动物和组织之间变化。例如,rAAV的有效量通常在约1ml至约100ml溶液的范围,所述溶液含有约 10^6 至 10^{16} 个基因组拷贝(例如, 1×10^6 至 1×10^{16} ,包括端点)。在一些实施方案中,rAAV的有效量范围在 1×10^9 至 1×10^{14} 个rAAV基因组拷贝之间。在一些情况下,约 10^{11} 至 10^{12} 个rAAV基因组拷贝之间的剂量是合适的。在一些实施方案中,约 10^{11} 至 10^{13} 个rAAV基因组拷贝之间的剂量是合适的。在一些实施方案中,约 10^{11} 至 10^{14} 个rAAV基因组拷贝之间的剂量是合适的。在一些实施方案中,约 10^{11} 至 10^{15} 个rAAV基因组拷贝之间的剂量是合适的。在一些实施方案中,约 10^{12} 至 10^{14} 个rAAV基因组拷贝的剂量是合适的。在一些实施方案中,约 10^{13} 至 10^{14} 个rAAV基因组拷贝的剂量是合适的。在一些实施方案中,约 1×10^{12} 、约 1.1×10^{12} 、约 1.2×10^{12} 、约 1.3×10^{12} 、约 1.4×10^{12} 、约 1.5×10^{12} 、约 1.6×10^{12} 、约 1.7×10^{12} 、约 1.8×10^{12} 、约 1.9×10^{12} 、约 1×10^{13} 、约 1.1×10^{13} 、约 1.2×10^{13} 、约 1.3×10^{13} 、约 1.4×10^{13} 、约 1.5×10^{13} 、约 1.6×10^{13} 、约 1.7×10^{13} 、约 1.8×10^{13} 、约 1.9×10^{13} 或约 2.0×10^{14} 个载体基因组(vg)拷贝/千克(kg)体重是合适的。在一些实施方案中,约 4×10^{12} 至 2×10^{13} 个rAAV基因组拷贝之间的剂量是合适的。在一些实施方案中,通过静脉内施用的约 1.5×10^{13} vg/kg的剂量是合适的。在某些实施方案中, 10^{12} - 10^{13} 个rAAV基因组拷贝对靶组织(例如,眼)是有效的。在某些实施方案中, 10^{13} - 10^{14} 个rAAV基因组拷贝对靶组织(例如,眼)是有效的。

[0182] 在一些实施方案中,将rAAV注射至受试者。在其他的实施方案中,通过外用施用(例如,滴眼剂)将rAAV施用至受试者。在一些实施方案中,rAAV的有效量是足以在受试者的靶组织(例如眼)中表达有效量的所述人VEGF受体融合蛋白的量。

[0183] 在一些实施方案中,通过注射递送的rAAV(例如,递送编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV的有效量是足以在靶组织中表达有效量的人VEGF受体融合蛋白的量。在一些实施方案中,递送有效量的编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV足以通过合适的施用途径(例如,眼内注射、i.v.注射、腹膜内注射和肌内注射)向受试者每眼递送 $10 \mu\text{g}$ 至10mg或介于之间的任何中间值的人VEGF受体融合蛋白。在一些实施方案中,编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV足以

向受试者每眼递送20 μ g至5mg或介于之间的任何中间值的人VEGF受体融合蛋白。在一些实施方案中,编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV足以向受试者每眼递送10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g、50 μ g、60 μ g、70 μ g、80 μ g、90 μ g、100 μ g、200 μ g、300 μ g、400 μ g、500 μ g、600 μ g、700 μ g、800 μ g、900 μ g、1mg、1.5mg、2mg、2.5mg、3mg、3.5mg、4mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg、10mg或更多的人VEGF受体融合蛋白。

[0184] 在一些实施方案中,将编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV每天一次、每周一次、每两周一次、每个月一次、每2个月一次、每3个月一次、每6个月一次、一年一次或受试者的一生一次地施用给受试者。

[0185] 在一些实施方案中,通过外用施用如滴眼剂递送的rAAV的有效量是以足以在靶组织中表达有效量的人VEGF受体融合蛋白的量。在一些实施方案中,将含有编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV的滴眼剂每周一次、每个月一次、每3个月一次、每6个月一次或每年一次地施用给受试者。

[0186] 在一些实施方案中,滴眼剂包含的编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV足以递送浓度为1mg/ml至20mg/ml的人VEGF受体融合蛋白。在一些实施方案中,滴眼剂包含的编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV足以递送浓度为2.5mg/ml至10mg/ml的人VEGF受体融合蛋白。在一些实施方案中,滴眼剂包含的编码人VEGF受体融合蛋白的rAAV足以递送浓度为1mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml或20mg/ml的人VEGF受体融合蛋白。在一些实施方案中,滴眼剂以0.01ml、0.02ml、0.03ml、0.04ml、0.05ml、0.06ml、0.07ml、0.08ml、0.09ml、0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml或0.5ml来施用。

[0187] 在一些实施方案中,本公开描述的方法进一步包括在受试者被施用rAAV(例如,本公开所述的rAAV或药物组合物)之前在受试者中诱导免疫抑制(例如,施用一种或多种免疫抑制剂)的步骤。在一些实施方案中,在向受试者施用rAAV之前的约30天至约0天之间(例如,施用rAAV前的30天之内的任何时间,包括端点),对受试者进行免疫抑制(例如,在受试者中诱导免疫抑制)。在一些实施方案中,将受试者用免疫抑制剂(例如,利妥昔单抗、西罗莫司和/或泼尼松)预处理至少7天。

[0188] 在一些实施方案中,本公开中描述的方法进一步包括向被施用本公开的rAAV或包含rAAV的药物组合物的受试者共同施用或预先施用药剂。在一些实施方案中,所述药剂选自米格鲁他(Miglustat)、开浦兰(Keppra)、兰索拉唑(Prevacid)、氯硝西洋(Clonazepam)及其任何组合。在一些实施方案中,可以以任何顺序将rAAV和额外药剂递送至受试者。在一些实施方案中,将rAAV和额外药剂(例如,米格鲁他、开浦兰、兰索拉唑、氯硝西洋)同时递送至受试者。在一些实施方案中,将rAAV和额外药剂(例如,米格鲁他、开浦兰、兰索拉唑、氯硝西洋)共同施用给受试者(例如,在一种组合物中或在不同组合物中)。在一些实施方案中,rAAV在额外药剂(例如,米格鲁他、开浦兰、兰索拉唑、氯硝西洋)之前递送。在一些实施方案中,rAAV在额外药剂(例如,米格鲁他、开浦兰、兰索拉唑、氯硝西洋)之后递送。在一些实施方案中,以不同频率将rAAV和额外药剂(例如,米格鲁他、开浦兰、兰索拉唑、氯硝西洋)递送至受试者,例如,受试者每个月、每两个月、每六个月、每年、每两年、每三年、每5年或更长时间地接受rAAV,但每天、每周、每两周、每个月、每天两次、每天三次或每周两次地接受额外药剂(例如,米格鲁他、开浦兰、兰索拉唑、氯硝西洋)。

[0189] 在一些实施方案中,在施用rAAV或药物组合物期间和/或之后维持受试者的免疫抑制。在一些实施方案中,在施用rAAV或药物组合物之后将受试者免疫抑制(例如,施用一种或多种免疫抑制剂)1天至1年之间的时间。

[0190] 本发明的另一个方面提供一种治疗对象中VEGF导致的疾病的方法,所述方法包括向所述对象使用治疗有效量的本发明的rAAV或药物组合物。在优选的实施方式中,所述VEGF导致的疾病是VEGF过表达导致的疾病。

[0191] 在优选的实施方式中,所述VEGF导致的疾病选自渗出性(湿性)老年黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变(DR)合并黄斑水肿(DME)、视网膜静阻塞(RVO)合并黄斑水肿(ME)、中心性渗出性脉络膜视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、高度近视继发脉络膜新生血管病变以及继发的黄斑脉络膜新生血管(CNV)。在更优选的实施方式中,所述VEGF导致的疾病选自渗出性(湿性)老年黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变(DR)合并黄斑水肿(DME)或视网膜静阻塞(RVO)合并黄斑水肿(ME)。

[0192] 相应地,本发明提供所述基因递送载体或药物组合物在制备用于治疗VEGF导致的疾病的药物中的应用。在优选的实施方式中,所述VEGF导致的疾病选自渗出性(湿性)老年黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变(DR)合并黄斑水肿(DME)、视网膜静阻塞(RVO)合并黄斑水肿(ME)、中心性渗出性脉络膜视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、高度近视继发脉络膜新生血管病变以及继发的黄斑脉络膜新生血管(CNV)。在更优选的实施方式中,所述VEGF导致的疾病选自渗出性(湿性)老年黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变(DR)合并黄斑水肿(DME)或视网膜静阻塞(RVO)合并黄斑水肿(ME)。

[0193] 序列表

SEQ ID NO.	说明	序列
1	Aflibercept VEGFR1/D2	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVITSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYT HRQTNTIID

	阿柏西普 VEGFR1 免疫球蛋白样结构域 2	
2	Aflibercept VEGFR2/D3 阿柏西普 VEGFR2 免疫球蛋白样结构域 3	VVLSPSHGI ELSVGEKLVLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PPSKHQHKLLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
3	Aflibercept-Fc 阿柏西普铰链-Fc	DKTHTCP PPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPG
4	信号肽	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSSG
5	Fc-YTE- Aflibercept (AA)	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMT EGRELVI PCRVTSFNITVTLK KFPDLTLPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PPSKHQHKLLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCP PPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPG
6	Conbercept R1/D2 康柏西普 VEGFR1 免疫球蛋白样结构域 2	GRPFVEMYSEIPEIIHMT EGRELVI PCRVTSFNITVTLK KFPDLTLPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID
7	Conbercept R2/D4 康柏西普 VEGFR2 免疫球蛋白样结构域 4	PFVAFSGMESLVEATVGERVRI PAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVS LVVYVPPGPG
8	Conbercept-Fc 康柏西普铰链-Fc	DKTHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
9	Fc-YTE- Conbercept (AA)	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSSGGRPFVEMYSEIPEIIHMT EGRELVI PCRVTSFNITVTLK KFPDLTLPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNVDGIDFNWEY PPSKHQHKLLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFSGMESLVEATVGERVRI PAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVS LVVYVPPGPGDKTHTCP PPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
10	Fc-YTE- Aflibercept (DNA)	Atgggtgtcctactgggacacagggcgtgctgtgtgctgcacctgctgtcttgtctgctgctgacaggatctagcagcggcagcgatacaggccggcctttgtggaaatgtactctgaaatccccgagatcatccacatgaccgagggcagagagctggtgatccccctgcagagtcacatcccccaacatcaccctgaccctgaagaaatccccctggataccctgatccctgacggcaagagaatcatctgggatagcagaaaaggctttatcatcagcaacgccacctacaagaaatcggcctgctgacctgcgaggccactgtgaaacggccacctgtacaagacaaactacctgacacacagacagaccaacacatcattgatgtggtgctctctcctagccacggcatcgagctgtctgtggcgagaaactggtgctgaactgcaccgctagaaccgagcttaaagtgggaatcgacttcaattgggagtatccatcaagtaagcaccacacaagaagctggtgaacagggacctgaaaacacagagtggtctgagatgaaaaagttcctgagcaccctgacaatcgacggagttacaagaagcgaccagggcctgtacacctgtgccccagcagcggcctgatgaccaagaagaatagcacatttgtgctgggtgcacgagaaggacaagaccacacctgcccaccatgtcctgctcctgagctgctggggggccctagcgt

		<pre>gttcctgttccctcctaagcccaaggataccctgtacatcaccagag agcccgaggtgacctgctgggtggtcgacgtgtctcatgaagatcct gaggtgaagttcaactggtacgtggacggagttgaagtgcacaatgc caagaccaagcctagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtgg tcagcgtgctgacctcctgcaccaggactggctgaacggcaagaa tacaatgcaaggtgtccaacaaggcctgcccgccctatcgagaa gacgattagcaaagctaagggaacagcctcgggaaccccagggtgaca ccctgcctccaagccgggacgagctgacaaagaaccagggtgtccctg acatgtctggtaagggttctaccctctgatatcgccgtggaatg ggaaagcaacggccaacctgaaaacaactacaaaacaaccctcctg tgctggacagcagcggcagcttcttctgtatagcaagctgacctg gataagagcctggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgat gcacgaggcccttcataatcactacaccagaagtccctgagcctga gccctggctaa</pre>
<p>11</p>	<p>Fc-YTE- Conbercept (DNA)</p>	<pre>atggtcagctactgggacaccggggtcctgctgtgcccgtgctcag ctgtctgcttctcacaggatctagtccggaggtagaccttctgtag agatgtacagtgaaatccccgaaattatacacatgactgaaggaaag gagctcgtcattccctgcccgggttacgtcacctaactcactgttac tttaaaaaagtttccacttgacactttgatccctgatggaaaacgca taatctgggacagtagaaaaggcttcatcatatcaaatgcaacgtac aaagaaatagggttctgacctgtgaagcaacagtcaatgggcattt gtataagacaaactatctcacacatcgacaaaaccaatacaatcatag atgtggttctgagtcctctcatggaattgaaactatctgttgagaaa aagcttgtcttaaatgtacagcaagaactgaaactaaatgtggggat tgacttcaactgggaatacccttcttogaagcatcagcataaagaac ttgtaaacgagacctaaaaaccagtctgggagtgagatgaagaaa tttttgagcaccttaactatagatggtgtaaccgggagtgaccaagg attgtacacctgtgcagcatccagtgggctgatgaccaagaagaaca gcacatttgtcaggggtccatgaaaaacctttgttgcttttggaagt ggcatggaatctctggtggaagccacggtgggggagcgtgtcagaat ccctgcgaagtaccttgggtacccacccccagaaataaaatggtata aaaatggaataccctttagtccaatcacacaattaaagcggggcat gtactgacgattatggaagtgagtgaagagacacaggaaattacac tgtcatccttaccatccatttcaaaggagaagcagagccatgtgg tctctctggttgtgtatgtcccaccgggcccgggacaaaactcac acatgcccactgtgccagcactgaaactcctgggggacccgtcagt cttctcttcccccaaaaacccaaggacaccctctacatcacccggg agcctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacct gaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgc caagacaaagcccgaggagcagtagcaaacagcacgtaccgtgtgg tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaatggcaaggag tacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaa aaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca ccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctg acctgcctagtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg ggagagcaatgggcagccggagaaactacaaggccacgcctcccg tgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtg gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgt ctccgggtaaatga</pre>

实施例

[0194] 实施例1.rAAV-Fc-YTE-阿柏西普的制备

[0195] 获得的Fc-YTE-阿柏西普基因序列 (SEQ ID NO.10) 装载到AAV主质粒 (GOI质粒) (质粒图谱见图1), 在辅助质粒 (如:Helper质粒、R/C质粒) 的帮助下制备出相应的重组腺相关病毒 (rAAV) 药物rAAV-Fc-YTE-阿柏西普 (也称“rAAV-Fc-YTE”)。在该实施例中, 主质粒骨架采用cceAAV基因组构型, 启动子元件采用CMV启动子序列, PolyA元件采用SV40晚期PolyA序列, 病毒衣壳采用AAV8血清型。

[0196] 采用三质粒系统进行AAV病毒包装生产, 由下列三质粒系统在HEK293细胞中通过瞬时转染完成。三质粒和其功能分别描述如下。

[0197] 主质粒 (GOI质粒): 如前所述, 含有Fc-YTE-阿柏西普基因序列表达框的载体基因组DNA, 给药后可在体内靶组织中表达Fc-YTE-阿柏西普蛋白分子 (氨基酸序列如SEQ ID

NO.5所示)。

[0198] R/C质粒(辅助质粒):反式提供rAAV中的Rep和Cap蛋白,和主质粒基因分列于两个独立质粒系统,将使Rep和Cap只在rAAV中表达结构,而删除了rAAV复制功能。

[0199] Helper质粒(附属质粒):载有腺病毒中启动AAV复制必须的基因片段,如E2、E4a、VA等,在HEK293细胞中与GOI主质粒、R/C质粒共转染,共同作用下包装制备出rAAV-Fc-YTE-阿柏西普病毒,其结构示意图如图2所示。随后,进行相关质量检测,主要包括病毒基因组滴度(Vg)、衣壳蛋白纯度、病毒颗粒数(Vp)、宿主细胞DNA残留(HCD)、宿主细胞蛋白残留(HCP)和细菌内毒素等,确认均符合相应要求。

[0200] 实施例2.rAAV-Fc-YTE-阿柏西普显著降低FFA光斑评分和面积

[0201] 使用激光诱导的C57BL/6J小鼠(雄性,约6周)CNV模型对实施例1提供的rAAV-Fc-YTE-阿柏西普进行药效验证、药效评价和对比。

[0202] 1) 分组及给药方案

[0203] 阴性对照:阴性对照试剂(溶媒试剂Buffer)

[0204] 阳性对照1:阳性药物分子(购买的临床使用的阿柏西普蛋白注射剂)

[0205] 阳性对照2:rAAV-Eylea

[0206] 实验组:rAAV-Fc-YTE

[0207] rAAV-Eylea组与rAAV-Fc-YTE组相比,前者的Eylea(阿柏西普商品名)的IgG1的Fc片段为野生型Fc,不带YTE定点突变优化。二者采用相同的主质粒表达框架、调控元件,并按实施例1所述方法制备。

[0208] 分组及给药方案

	受试物组别	动物数	剂量	注射部位
G1	rAAV-Eylea	6	1×10^9 vg/ μ L/eye	SRI, 双眼
G2	rAAV-Fc-YTE	6	1×10^9 vg/ μ L/eye	SRI, 双眼
G3	阴性对照试剂	6	1 μ L	SRI, 双眼
G4	阳性药物分子	6	20 μ g/eye	IVT, 双眼

[0209] 注:给药4周后造模,造模当天记为Day0。

[0210] 在Day-28,给药前使用舒泰(25-50mg/kg, i.p.)+盐酸赛拉嗪注射液(5mg/kg, i.p.)麻醉动物。G1~G3组动物双眼单次视网膜下腔注射不同剂量的受试物和Buffer,1 μ L/眼;G4组动物在造模后Day3进行玻璃体注射阳性药,0.5 μ L/眼。

[0211] 视网膜下腔注射:使用碘伏消毒眼表,在眼科专用手术显微镜下用30G一次性注射针头在角巩膜缘内侧穿刺小鼠巩膜,用带有35G平针头的微量进样器沿穿刺口进入并绕过晶状体后到达玻璃体,避开主血管,然后逐渐进针至视网膜下腔隙,缓慢推注。注射器拔出后即刻用棉签压迫进针口5s。给药后即刻OCT检查确认注射成功,给药成功的判断标准为OCT下观察可见视网膜明显隆起。

[0212] 给药后护理:给药后所有入组动物双眼用左氧氟沙星滴眼液和氧氟沙星眼膏护理,上午下午各一次,连续三天。

[0213] 2) 造模:

[0214] 在Day 0 (给药4周后),使用舒泰(25-50mg/kg, i.p.)和盐酸赛拉嗪注射液(5mg/kg, i.p.)麻醉动物,使用YAG激光光凝仪(VITRA, Quantel Medical)以相同能量参数的532nm激光在双眼的RPE/Bruch膜烧灼3个激光斑(在距离视盘1-1.5PD处围绕视乳头均匀分布光凝3点),激光斑位置应避开视网膜大血管和注射点,防止眼内出血。

[0215] 激光成功标志:激光后立即OCT检测激光斑位置,以确认激光灼烧和Bruch膜可见破裂是否成功。

[0216] 3) 主要检测指标和检测结果:

[0217] 3.1) 临床观察:

[0218] 每天一次笼旁观察,观察动物有无死亡,精神状态,行为活动等情况。

[0219] 结果:入组动物每天一次笼旁观察,未见明显异常临床症状。

[0220] 3.2) SD-OCT:

[0221] OCT使用超高分辨率光谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)进行。将小鼠麻醉,瞳孔放大,并将小鼠定位为允许视神经头(ONH)出现在图像的中心。B扫描(平均5帧)和全场体积扫描(300帧)被捕获。

[0222] 在Day-28给药后即刻(rAAV-Eylea组,rAAV-Fc-YTE组、阴性对照试剂组)、及Day 0造模后即刻(rAAV-Eylea组,rAAV-Fc-YTE组、阴性对照试剂组、阳性药物分子组),对动物双眼进行SD-OCT扫描。

[0223] 结论:整个实验过程中入组动物未见异常临床症状。OCT扫描结果显示,Day-28给药后即刻(rAAV-Eylea组,rAAV-Fc-YTE组、阴性对照试剂组)动物视网膜均可见隆起,说明视网膜下注射给药成功;Day0造模后即刻(rAAV-Eylea组,rAAV-Fc-YTE组、阴性对照试剂组、阳性药物分子组)动物均可见激光灼烧和Bruch膜破裂,说明激光造模成功。

[0224] 3.3) FFA光斑评分和光斑面积:

[0225] 在造模后Day 7,对所有动物进行FFA检测。检测前使用舒泰(25-50mg/kg, i.p.)和盐酸赛拉嗪注射液(5mg/kg, i.p.)麻醉动物,荧光素钠注射后连续拍摄造影图像,分别在钠荧光注射后早期和晚期记录渗漏评分,渗漏等级为I-IV级,如下表。

[0226] FFA评分细节表

I级	无强荧光。
II级	病灶早期或中期呈高荧光,无渗漏。
III级	病灶早期呈高荧光,晚期渗漏。
IV级	病灶早期呈明亮的高荧光,晚期渗漏并超出烧伤区域的边界。

[0227] 结果:

[0228] 在造模后Day 7,对所有动物进行FFA检测,FFA评分及面积测量结果分别如图3和4所示,并且总结如下。使用FFA光斑面积来评判药效。光斑面积越小,药效越好。

[0229] FFA光斑评分(Mean \pm SEM)

组别受试物	眼睛数	造模后Day7光斑评分
rAAV-Eylea	n=12	2.31 \pm 0.10
rAAV-Fc-YTE	n=12	1.94 \pm 0.08
阴性对照试剂	n=12	3.56 \pm 0.11
阳性药物分子	n=12	2.39 \pm 0.14

[0230] FFA光斑面积 (mm^2 , Mean \pm SEM)

受试物组别	眼睛数	造模后Day7光斑面积
rAAV-Eylea	n=12	1.90 \pm 0.63
rAAV-Fc-YTE	n=12	0.08 \pm 0.08
阴性对照试剂	n=12	5.22 \pm 0.50
阳性药物分子	n=12	2.15 \pm 0.57

[0231] 小结:造模后Day7眼底血管荧光造影(FFA)结果显示:

[0232] a, 与阴性对照试剂组相比阳性药物分子组(阳性对照1), rAAV-Eylea组(阳性对照2)、rAAV-Fc-YTE组(实验组)的光斑评分及光斑面积均有显著性降低。

[0233] b, 与阳性药物分子组(阳性对照1), rAAV-Eylea组(阳性对照2)相比rAAV-Fc-YTE组(实验组)的FFA光斑面积显著降低。

[0234] 3.4) Elisa检测:造模后Day14(注射后42天), 阴性对照试剂组、rAAV-Eylea组(阳性对照2)、rAAV-Fc-YTE组(实验组)每组随机取材3只眼球, 采用Elisa方法检测各组中药物蛋白分子的表达分布水平。结果如图5所示并总结如下。

组号	动物号	眼别	蛋白表达量 ng/eye	平均表达量 ng/eye	SEM
rAAV-Eylea 组	39542	OD	466.77	602.25	81.63
	39544	OD	591.09		
	39545	OD	748.89		
rAAV-Fc- YTE 组	39510	OD	667.43	634.86	66.83
	39526	OD	506.32		
	39530	OD	730.84		
阴性对照试 剂组	39573	OD	4.30	1.13	2.07
	39576	OD	1.84		
	39579	OD	2.76		

[0235] 小结:

[0236] rAAV-Eylea组(阳性对照2)与rAAV-Fc-YTE组(实验组)均在靶组织小鼠眼球中有较高的蛋白表达水平, 且二者蛋白表达水平相当。

[0237] 3.5) 统计分析:

[0238] 实验数据应用均数 \pm 标准误表示(mean \pm S.E.M.)。数据由Graphpad Prism或SPSS采用相应的统计方法分析。对于FFA光斑评分和光斑面积数据使用Kruskal-Wallis test/Dunnett's (多组比较)、Mann-Whitney test (两组比较); 对于蛋白表达数据使用One-Way ANOVA进行比较分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

[0239] 3.6) 结论总结:

[0240] A, 实施案例中与阴性对照组相比, 实验组和2个阳性对照组均表现出显著差异和药效; 阳性对照1(玻璃体注射Eylea)与阳性对照2(视网膜下注射rAAV-Eylea)之间药效一致, 进一步表明本次造模实验体系是成功的。

[0241] B, 本发明实施例实验组药物rAAV-Fc-YTE组(实验组)与阳性对照2(视网膜下注射rAAV-Eylea)相比靶组织中药物蛋白表达水平无差异, 但与两个阳性对照组相比, 均表现出

显著且更好的药效。

[0242] 实施例3. 药物分子在靶组织中的表达分布实验

[0243] 1) 实验设计方案: 采用与实施例2实验相同的供试品, 采用与之相同的视网膜下腔注射方式和注射剂量 (1×10^9 vg/ μ L/eye, SRI, 双眼), 注射C57BL/6J小鼠, 并于Day33进行取材, 小鼠眼球样本进行石蜡包埋, 并采用mRNA水平的BaseScope技术检测目的药物蛋白基因在视网膜各层细胞中的表达分布情况 (目的蛋白为分泌蛋白, 因此, 采取BaseScope技术检测转录水平, 而非采用IHC技术检测蛋白水平)。

[0244] 阴性对照: 阴性对照试剂 (溶媒试剂Buffer)

[0245] 阳性对照: rAAV-Eylea

[0246] 实验组: rAAV-Fc-YTE (CRG-B191)

[0247] BaseScope代表结果如图6所示。

[0248] 结论: 结果表明阳性对照 (rAAV-Eylea) 和实验组 (rAAV-Fc-YTE) 相较于阴性对照 (阴性对照试剂) 均在靶组织中有高效表达。且阳性对照药物基因和实验组药物基因在视网膜各层结构中的表达分布相同: 即, 在视网膜RPE层、IS/OS层、以及外核层细胞中表达, 其中RPE细胞中表达水平最高。

[0249] 上述结果表明本发明对药物分子的改造, 在不改变药物分子在靶组织中的表达水平和表达分布的情况下, 可显著提高对目标疾病的治疗效果。

[0250] 实施例4. 重组蛋白药物CNV造模及FFA检测实验

[0251] 按实施例2所述的方法进行造模和FFA评分及检测。蛋白药物分组及给药方案如下表所示。结果显示Fc-YTE-阿柏西普蛋白直接眼内IVT给药的药效不劣于阿柏西普。

分组及给药方案

组号	受试物	动物数	剂量	注射方式	处理方式和时间
1	G1: 阴性对照 (PBS)	6	2ul/eye	IVT, 双眼	Day 0 造模, Day 3 单次给药, Day 7 FFA 检测
2	G2: 阿柏西普	6	2ul/eye(浓度用PBS 稀释至与受试物相同)	IVT, 双眼	Day 0 造模, Day 3 单次给药, Day 7 FFA 检测
3	G3: 受试物 (Fc-YTE-阿柏西普)	6	2ul/eye (6.34mg/ml)	IVT, 双眼	Day 0 造模, Day 3 单次给药, Day 7 FFA 检测

[0252] 造模后Day 7 FFA光斑评分结果 (Mean \pm SEM) 如下表及图7所示。

组别受试物	眼睛数	造模后Day7光斑评分
-------	-----	-------------

G1:阴性对照 (PBS)	n=12	3.03±0.16
G2:阿柏西普	n=12	2.50±0.18
G3:受试物 (Fc-YTE-阿柏西普)	n=12	2.69±0.18

[0253] 造模后Day 7 FFA光斑面积结果 (mm², Mean±SEM) 如下表及图8所示。

受试物组别	眼睛数	造模后Day7光斑面积
G1:阴性对照 (PBS)	n=12	5.25±0.82
G2:阿柏西普	n=12	2.99±0.60
G3:受试物 (Fc-YTE-阿柏西普)	n=12	2.94±0.55

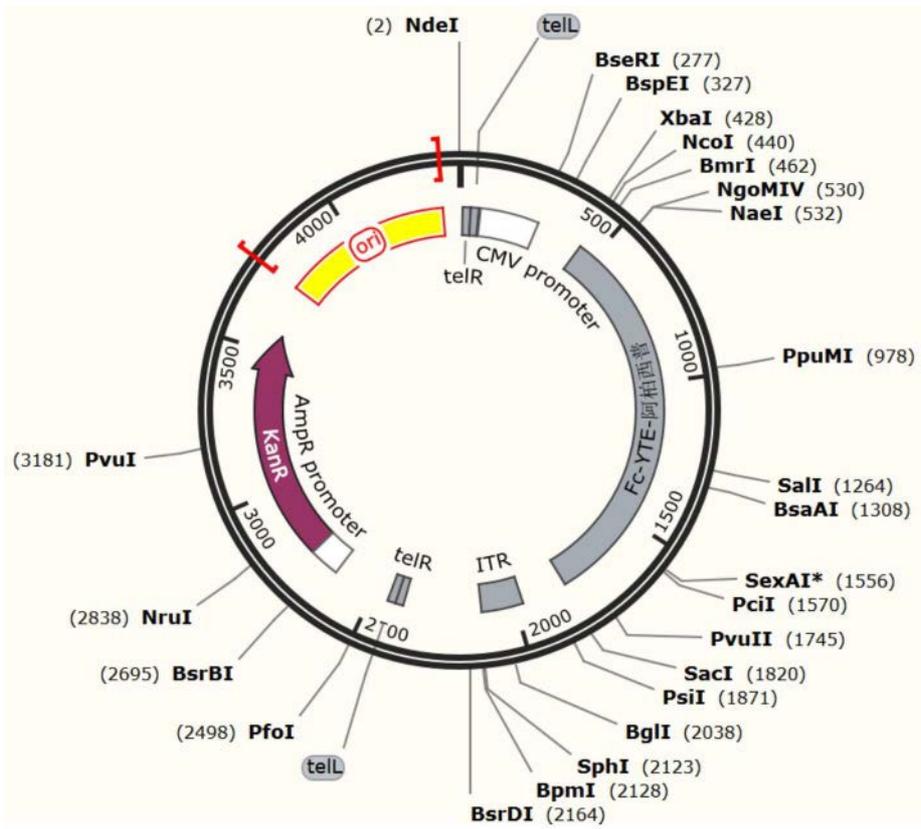


图1

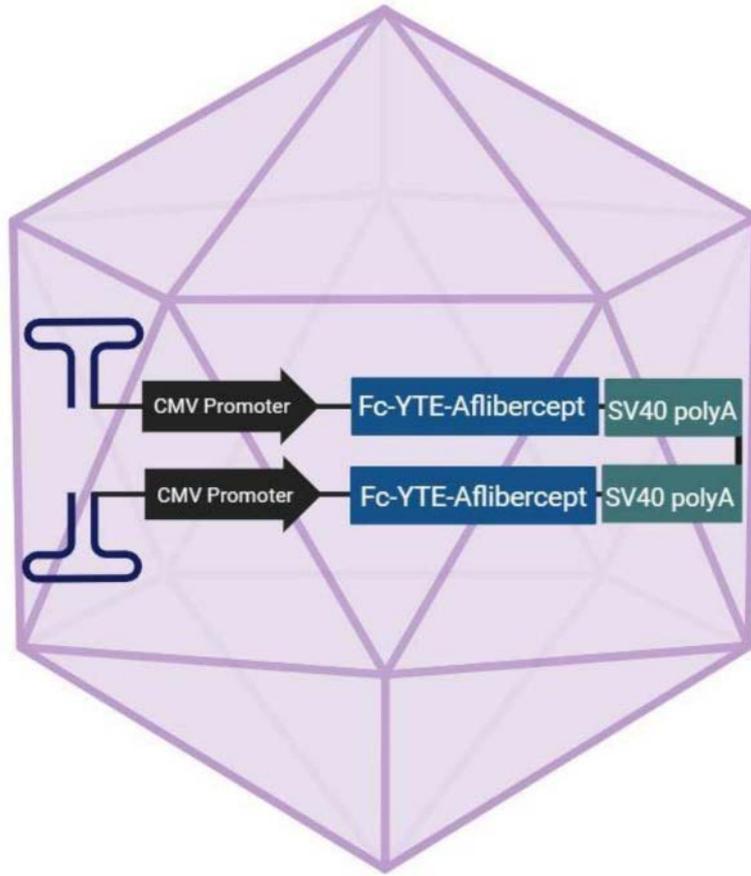


图2

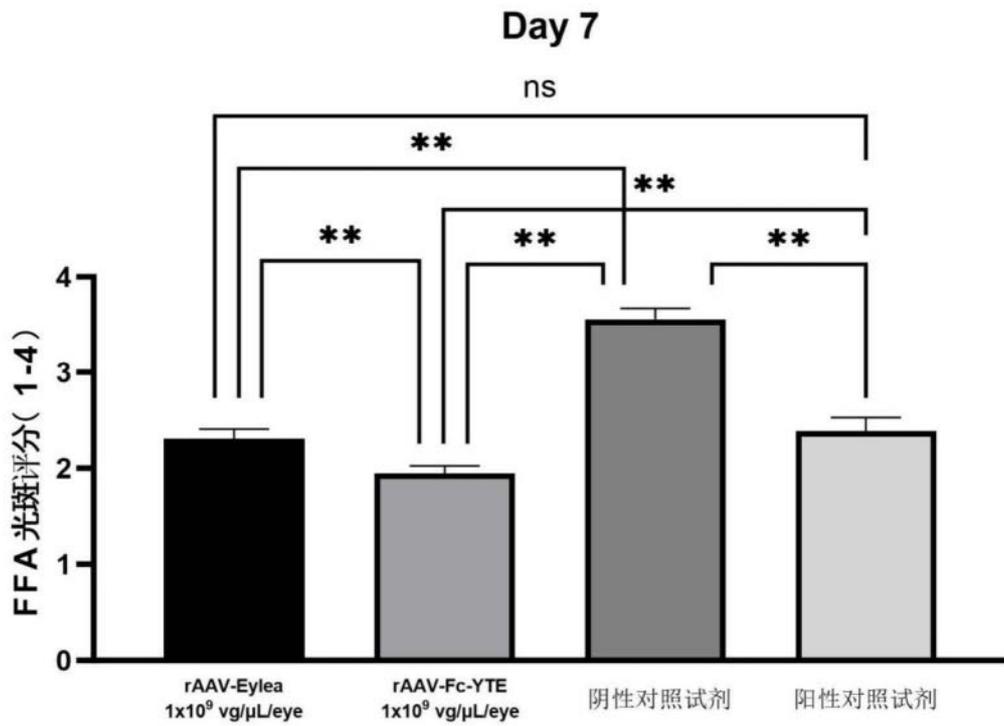


图3

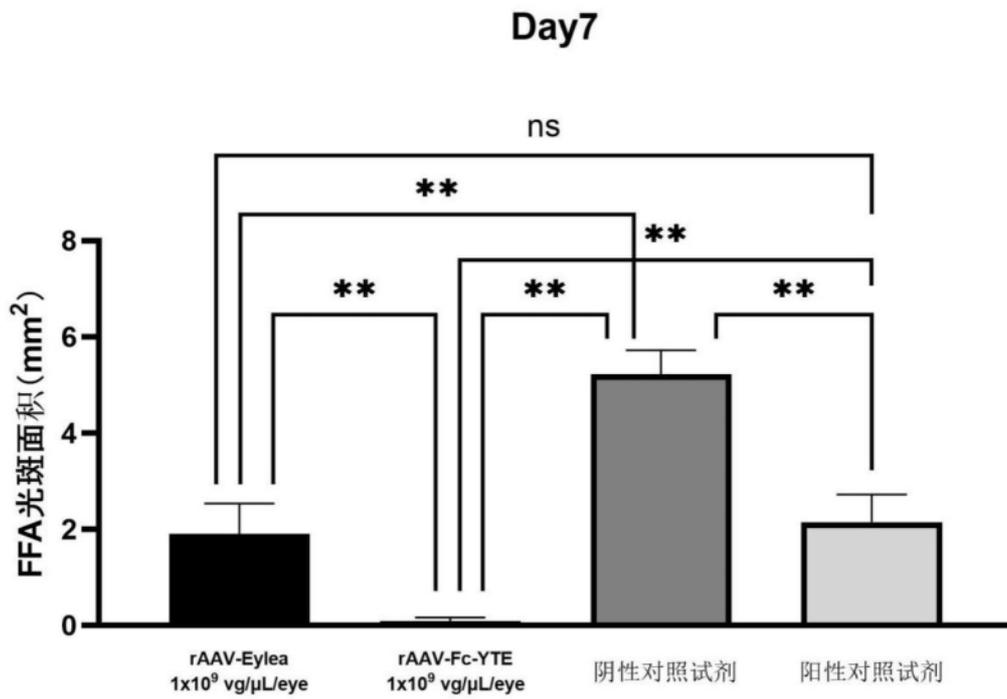


图4

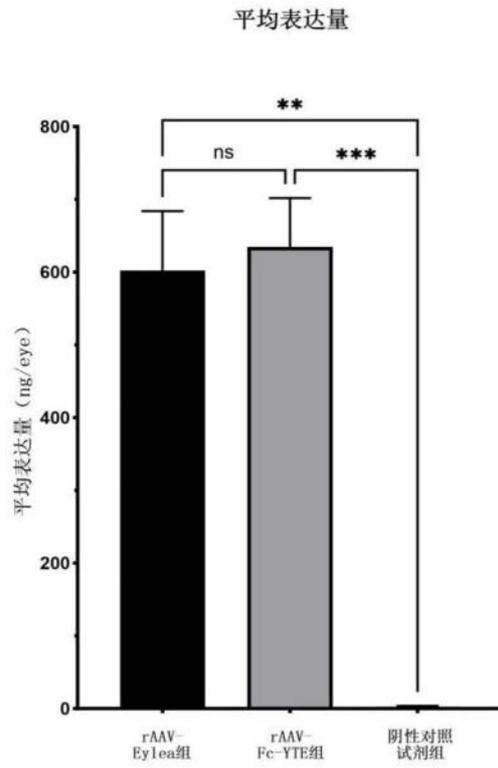
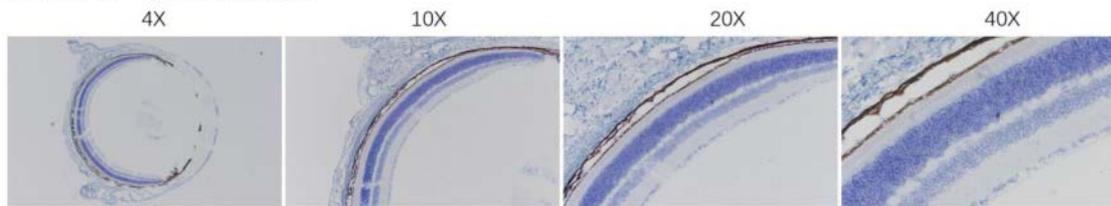
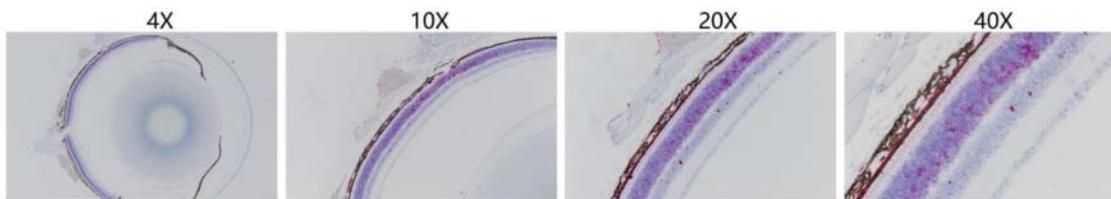


图5

阴性对照：阴性对照试剂



阳性对照：rAAV-Eylea



实验组：rAAV-Fc-YTE

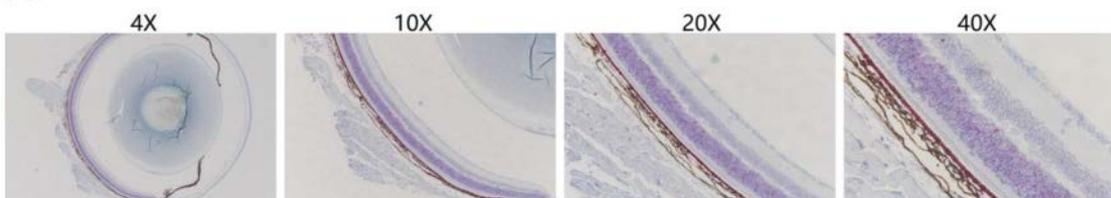


图6

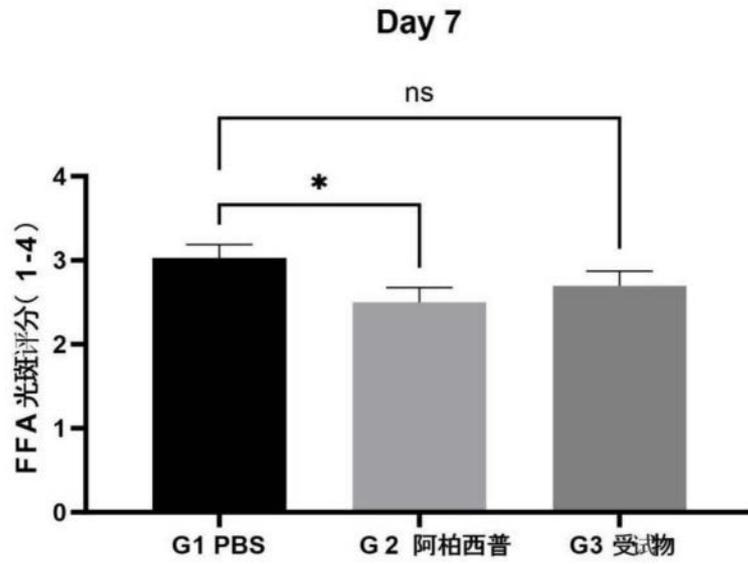


图7

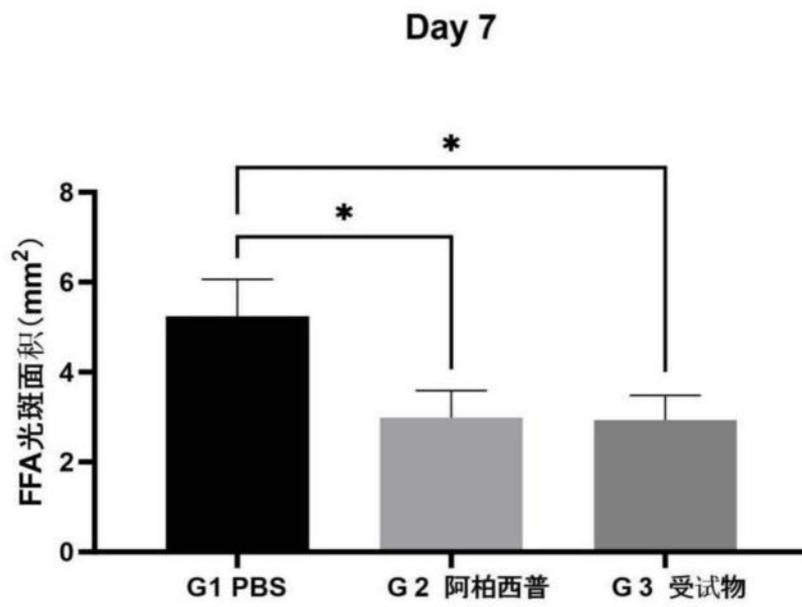


图8